

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ GENEL BOTANİK KÜRSÜSÜ

GÖVDE PASINA (*Puccinia graminis* var. *tritici*)
DAYANIKLILIKLARI FARKLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİ
ÜZERİNDE BİYOKİMYASAL DAYANIKLILIK
MEKANİZMALARININ KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Asist. Banu KONAK

ANKARA 1982

TEŞEKKUR

Yüksek Lisans eğitimiminde ve tez çalışmalarımında yardım-larını esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr.Ergin Duygu'ya, labora-tuvardan çalışmalarım sırasında her türlü olanağı sağlayan A.Ü.Fen Fakültesi Genel Botanik Kürsü'sünün tüm personeline, materyal temininde hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan Tarım ve Orman Bakan-liği Zırai Araştırma Enstitüsü personeline teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKUR	-
GİRİŞ	1
MATERYAL VE METOD	6
SONUÇLAR	
1- DNA miktarındaki değişimler	8
2- RNA miktarındaki değişimler	19
3- Serbest amino asit azotu mik-	
tarındaki değişimler	22
TARTIŞMA	26
OZET	41
LİTERATUR	43

GİRİŞ

Bağday gövde pası *Puccinia graminis* var. *tritici* bağday çeşitleri üzerinde çok etkili bir patojendir. Kimyasal metodlarla mücadele kesin etkili olmadığı gibi, ekonomikte olmamaktadır. Bu yüzden gövde pası ile mücadelenin en etkili yolu olarak dirençli türlerin yetiştirilmesi seçilmişdir. Islah çalışmaları çok uzun bir süreyi gerektirdiği gibi, beklenen olumlu sonucun elde edilmesi her zaman olası değildir. Bu yüzden dirençliliğin fizyolojik ve biyokimyasal yönden incelenmesinin gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu konuda yapılan detaylı çalışmalar sonucunda çeşitli direnç mekanizmaları bulunmuştur. Mekanik direnç mekanizmaları olduğu gibi, biyokimyasal direnç mekanizmalarında tartışılmıştır.

Mekanik teoriye göre kalın kutiküla, mumsu tabaka, küçük stomalar, çok sayıdaki yaprak tüyleri, yukarı doğru dik yapraklar bazı bağday çeşitlerinin *Puccinia graminis*'e karşı dirençliliğini artırırlar. (Cobb 1892)

Genellikle fungus enfeksiyonları aktiftir ve konak dokusuna stomalar gibi doğal deliklerden girerler. Günün erken saatlerinde, nemin fazla olduğu zaman, güneşin ilk ışınları ile açılan stomalar, pas girişini elverişli hale getirirler. (Hart 1929) Aydınlık ve karanlık peryot, bağday çeşidine kullanılan pas ırkına bağlı olarak farklılık gösterir. (Hart ve Forbes 1935) *Puccinia graminis* girişi sadece aydınlatır olur. (Yirgau ve Caldwell 1963)

Gövde pası epidemileri sıcak ve nemli hava per-yodunda çok daha kolay ortaya çıkarlar. Kuru ve sıcak hava gibi nemli ve soğuk havada enfeksiyon için elverişli değildir. (Mehta ve Melander 1935)

Bütün bu faktörlerle ilgili bilgiler *Puccinia graminis* penetrasyonuna etkili oldukları fikrini veriyorsada, dirençliliğe katkılardının ne kadar olduğu tartışılmaktadır. Hastalığa direnç bitkinin hastalanmadan fungus ile birlikte büyümeyidir. Hassasiyet bitkinin, aynı koşullar altında ne kadar hastalandığının bir ölçüsüdür. İmmuniteti kesin olarak tanımlamak zordur. Hiç bir hastalık delilinin gelişmediği, dirençliliğin en üst seviyesi olarak tanımlayabiliriz. Uyumsuz, hipersensitif reaksiyon gösteren dayanıklı çeşitlerde, biyokimyasal ve sitolojik değişimler, uyumlu reaksiyon gösteren hassas çeşitlerden çok daha hızlı geliştiğinden, patojen hücre içinde normal gelişimi için gerekli süreyi tamamlayamadığı için lezyon yayılmaz. Uyumlu reaksiyon gösteren hassas çeşitlerde ise bu değişimler çok yavaş yürüdüğünden patojen normal gelişimini tamamlayarak hücreden hücreye yayılır. Tamamen dayanıklı çeşitlerde ise patojenin gelişmesini önleyen biyokimyasal değişimler olduğundan hücreler bozulmaz ve lezyon oluşmaz. Dayanıklılık konak bitkinin dış çevreden etkilenişine, enfeksiyon öncesi ve sonrasında oluşan özelliklerine bağlıdır. Enfeksiyon sonrasında bitki metabolizmasında nükleik ásit ve total azot miktarında önemli farklılıklar bulunmuştur.

Enfekte bitkilerde nükleik asit metabolizması konusunda çok çalışılmıştır. Hastalıklı dokuda oluşan metabolik değişimlerin temeli ve bitkinin enfeksiyona tepkisinin anlaşılması konusunda çok yararlı olmuştur.

Pas ile enfekte buğday yapraklarında konak mezofil hücrelerindeki, çekirdek ve çekirdekcikler enfeksiyonun erken safhalarında büyürler ve daha sonra, enfeksiyonun ileri dönerlerinde bozulurlar. (Allen, 1923) *Puccinia graminis* ile enfekte hassas Little Club buğdayında enfeksiyondan 5 gün sonra çekirdek büyümesi ile birlikte RNA artar. Dirençli çeşit Khaplı de ise artış görülmez. Kontrol yapraklarında RNA kaybı yaşlanmaya bağlı olarak olur. (Person, 1960; Whitney, Shaw ve Naylor, 1962; Quick ve Shaw, 1964; Heitefuss, 1964, 1965, 1966) *Puccinia graminis* var. tritici ile enfekte hassas buğday döklärındaki RNA artışı, artan solunum ile birlikte olur. (Quick ve Shaw, 1964) Enfeksiyonu takip eden dönemde DNA miktarında genellikle çok az bir değişim olur. (Millerd ve Scott, 1963) Enfekte dokuda çekirdek büyümesi ile ilgili olarak DNA artışı görülebilir. Enfeksiyonun son döneminde ise çekirdek parçalanması büyük oranda DNA kaybına neden olur. (William, 1966; Whitney, Shaw ve Naylor, 1962) Aynı konak parazit biriminde RNA'nın spesifik aktivitesi $^{32}P_i$ ile takip edilerek ölçüldü. Kontrollere göre yüksek artışlar enfeksiyondan 4-5 gün sonra ilk semptomların olduğu zaman elde edildi. Dirençli bitkilerde fosforun bağlanması enfeksiyondan etkilenmez. (Rohringer ve Heitefuss, 1961)

Küllemeli arpa yapraklarında enfeksiyondan sonraki 2. günde RNA seviyelerinde artışlar olur. Kontrol yaprak değerlerinin üzerindeki bu artışlar, fungusun sporulasyon safhasındaki gelişimi ile aynı döneme rastlar. Bundan sonra RNA miktarı hastalıklı yapraklarda hızla düşer. (Milled ve Scott, 1963; Malca ve Plumb, 1968) Bu sonuçlara göre hem pas, hemde külleme enfeksiyonlarında symptom oluşumu ile az çok ilgili önemli bir RNA sentezi vardır.

Puccinia graminis ile enfekte hassas bitkilerde amino asit ve amid depolanması olur. Protein sentezi ve proteoliz olayları buna paralel artar. Hastlığın ileri dönemlerinde total azot miktarı düşer. Düşen azot miktarı enfekte dokularda hücre yapısının bozulması ve proteolitik enzim aktivite artışı ile ilgilidir. Serbest ammonia miktarının artmasının sonucu olarak deaminaz ve deamidaz artar. (Kiraly ve Farkas, 1961; Samborski ve Shaw, 1956; Rudolph, 1963) Hassas çeşitlerde fungus gelişirken total protein, total azot ve çözünür azot oranı sağlıklı bitkilere göre daha fazladır. Dirençli bir çeşidin enfeksiyonu protein ve çözünür azot azalmasına neden olur. (Shaw ve Colotel, 1961) Bazı çalışmalarda ise hassas çeşit enfeksiyonunda çözünür azot azalırken amino asit ve polipeptidler şeklinde protein sentez hızı artar. (Nilova ve Stephanova, 1958)

Enfeksiyon yaprak proteinlerinin amino asit kompozisyonunu değiştirmez. (Rohringer, 1957) Genellikle enfeksiyon sonrası, dirençli ve hassas çeşitlerde amino asit konsantrasyonu

yonunda artış olur. Pas gelişimini önleyen maddeler yaprakta amino asit birikimine neden olur. Belirli amino asitlerin konak dokusuna verilmesi, pasa~~s~~ karşı dirençliliği artırırken, bazı amino asit analoglarında enfeksiyonu inhibe eder. Bu durum uygun amino asitlerle tersine çevrilebilir. Dirençlilik amino asitleride içeren metabolik reaksiyonlara dayanabilir. Konak amino asitlerinde meydana gelen, konsantrasyonun artışı yönündeki bir dengesizlik dirençliliği artırır. (Samborski ve Forsyth, 1960; Siebert, 1961; Pozsar, Kristev ve Kiraly, 1966)

Bu çalışmada buğday yaprakları üzerindeki zararlı etkisi saptanmış olan *Puccinia graminis* var. tritici ile enfekte edilmiş, bazı dayanıklı, orta dayanıklı ve hassas buğday çeşitlerinde ortaya çıkan biyokimyasal dengesizlik konu edilerek, bu parazite karşı oluşturulan biyokimyasal dayanıklılık mekanizmasında yer aldığı öngörülen total DNA, RNA ve serbest amino asit analizleri yapılmış ve biyokimyasal dayanıklılık mekanizmalarındaki farklılıklar tartışılmıştır.

MATERIAL VE METOD

Denemelerde MB 81 (enfeksiyon tip 1), MB 83 (enfeksiyon tip 1), MB 84 (enfeksiyon tip 1), MB 121 (enfeksiyon tip 2), Little Club (enfeksiyon tip 4), Michigan Amber (enfeksiyon tip 4), Cheyenne (enfeksiyon tip 4) buğday çeşitleri kullanılmıştır. Dayanıklı, orta dayanıklı ve hassas buğday çeşitleri Puccinia graminis var. tritici ile enfekte edildi. Materiaşaller Tarım ve Orman Bakanlığı, Zirai Araştırma Enstitüsünden alındı. (Enfeksiyon tipleri Tablo I'de verilmiştir).

Denemeler sera şartlarında yürütüldü ve saksılara ekim yapıldı. İnokulasyon birinci yaprağın gelişimini kısmen tamamladığı 9. günde, birinci yapraklar yaklaşık 7-8 cm büyüğe ulaştığı zaman püskürtme yolu ile, 23-25°C da yapıldı. İnokule edilen bitkiler 48 saat nem ortamında tutuldu. Aynı işlemler kontrol bitkileri içinde tekrarlandı. Yalnızca püskürtme işlemi sırasında pas püstülleri kullanılmadı.

Saksıların nem ortamından çıkarıldığı gün inokulasyondan (enfeksiyondan) sonra 1. gün olarak kabul edildi. Numuneler inokulasyondan sonra 1, 5, 9, 12. günlerde alındı. Analizlerde bütün yaprak yüzeyi kullanıldı.

Seradan alınan örnekler en kısa sürede laboratuvara getirilerek, kurutma dolabında 100°C da kurutuldu. Kurutma dolabında 24 saat tutulan örnekler daha sonra öğütülerek eksiksizce hazırlı hale getirildi.

Ekstraktlar Holdgate ve Goodwin'in (1965) yöntemine

göre çıkarıldı. Total DNA ve total RNA analizleri Pederson'un (1969), total amino asit azotu analizleri Hedley ve Stoddart'in (1972) yöntemlerine göre yapıldı.

Tablo I: *Puccinia graminis* ve bugday çeşitleri için enfeksiyon tipleri.(Stakman ve Harrar, 1957)

Enfeksiyon tipi	Konak reaksiyonları
0	İmmun -O- Hiç pas püstülü gelişmez.
1	Çok dayanıklı -R- Pas püstülleri çok küçüktür ve ölü alanlarla çevrilidir.
2	Orta dayanıklı -MR- Püstüller küçüktür, genellikle konak dokusunun yeşil adacıkları, klorotik veya ölü dokularla çevrilidir.
3	Orta hassas -MS- Püstüller orta boydur, dağıntıdır, ölü alanlar yoktur, fakat klorotik alanlar bulunabilir. Özellikle elverişli koşullarda.
4	Çok hassas -S- Püstüller büyütür, genellikle birleşik ve sıktır, püstül çevresinde ölü alanlar yoktur, fakat bazı elverişsiz koşullarda bu dokuda sararma görülür.
5	Heterojen -X- Püstül boyutları çok değişiktir. Bazı durumlarda aynı bitki üzerinde yukarıdaki tiplerin bir karışımını bulabiliyoruz.

SONUÇLAR

1- DNA miktarındaki değişimler:

DNA değerleri Tablo II de kontrol (sağlıklı) ve enfekte (paslı) bitkiler için verilmiştir.

MB 81 dayanıklı çeşidinde *Puccinia graminis* var. tritici ile inoculasyondan 1 gün sonra DNA miktarı kontrolelle-re göre çok yüksektir. (yaklaşık kontrollerin 7.3 katı) Sürekli olarak düşmesine rağmen 5. günde de kontrol değerlerinin üstündedir. (yaklaşık 3.4 katı) 9. günde kontrol değerlerinin altına düşer. (kontrollerden yaklaşık 5 kez düşük) 12. güne doğru enfekte bitkilerde bir artış olurken, kontrollerde hafif bir düşme gözlendi. (Şekil 1A)

MB 83 dayanıklı çeşidinde enfekte bitkilerin inoculasyonundan 1 gün sonra DNA değerleri, kontrollerin 1.3 katıdır. Kontrol değerlerinde 5. günde olan düşüş nedeni ile bu oran 7.6 ya çıkarsada 9. günde enfekte bitki değerleri kontrollerin (4.2 kez) altına düşer. 12. günde her iki grup değerlerinde de düşme olur. (Şekil 1B)

MB 84 dayanıklı çeşidinde inoculasyondan 1 gün sonra enfekte bitkilerin DNA değerleri daha yüksektir. (kontrollerin yaklaşık 5 katı) 5. günde enfekte bitkilerde düşüş olurken, kontroller artar. Bu durum 9. günde de devam eder ve enfekte bitki değerleri kontrollerin altına düşer. (kontrollerden 5 kez düşük) 9 ve 12. günlerde DNA miktarları kontrollere paralel bir düşme gösterir. (Şekil 1C)

Tablo II: *Puccinia graminis* var. tritici ile enfekte bazı buğday çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde DNA miktarları. (mg/g kuru yaprak)

Kontrol (sağlıklı) bitkiler

Bugday çeşitleri	Enfeksiyondan sonra..... gün			
	1	5	9	12
Dayanıklı				
MB 81	3.6	3.7	15.5	14.3
MB 83	17.2	3.2	12.0	15.4
MB 84	3.1	6.0	14.7	12.2
Orta dayanıklı				
MB 121	3.0	7.6	5.0	8.5
Hassas				
Little Club	2.9	24.9	8.0	24.5
Michigan Amber	11.0	8.7	12.8	20.8
Cheyenne	12.7	15.7	12.0	26.9

Enfekte (paslı) bitkiler

Bugday çeşitleri	Enfeksiyondan sonra..... gün			
	1	5	9	12
Dayanıklı				
MB 81	26.4	12.8	3.0	4.5
MB 83	23.7	24.4	2.8	3.6
MB 84	16.3	6.0	4.6	3.9
Orta dayanıklı				
MB 121	11.6	23.9	2.3	2.3
Hassas				
Little Club	18.5	38.6	3.7	2.0
Michigan Amber	21.6	18.6	4.6	2.5
Cheyenne	10.8	18.0	2.4	3.5

Tablo III: Puccinia graminis var. tritici ile enfekte bazı buğday çeşitlerinde enfeksiyondan sonra rRNA miktarları (mg/g kuru yaprak)

Kontrol (sağlıklı) bitkiler

Buğday çeşitleri	Enfeksiyondan sonra..... gün			
	1	5	9	12
Dayanıklı				
MB 81	6.9	20.9	31.1	11.4
MB 83	25.0	47.5	24.8	16.8
MB 84	3.6	20.6	40.2	12.0
Orta dayanıklı				
MB 121	10.26	19.69	32.58	24.12
Hassas				
Little Club	36.04	62.02	35.58	26.2
Michigan Amber	11.9	30.25	25.5	24.1
Cheyenne	3.4	40.07	29.4	27.5

Enfekte (paslı) bitkiler

Bugday çeşitleri	Enfeksiyondan sonra..... gün			
	1	5	9	12
Dayanıklı				
MB 81	50.4	23.9	4.92	4.07
MB 83	41.6	39.4	3.8	2.1
MB 84	30.19	12.07	6.23	1.77
Orta dayanıklı				
MB 121	19.45	48.36	3.07	1.37
Hassas				
Little Club	34.73	78.14	3.34	2.45
Michigan Amber	35.9	37.1	3.29	0.6
Cheyenne	17.8	35.45	2.88	1.6

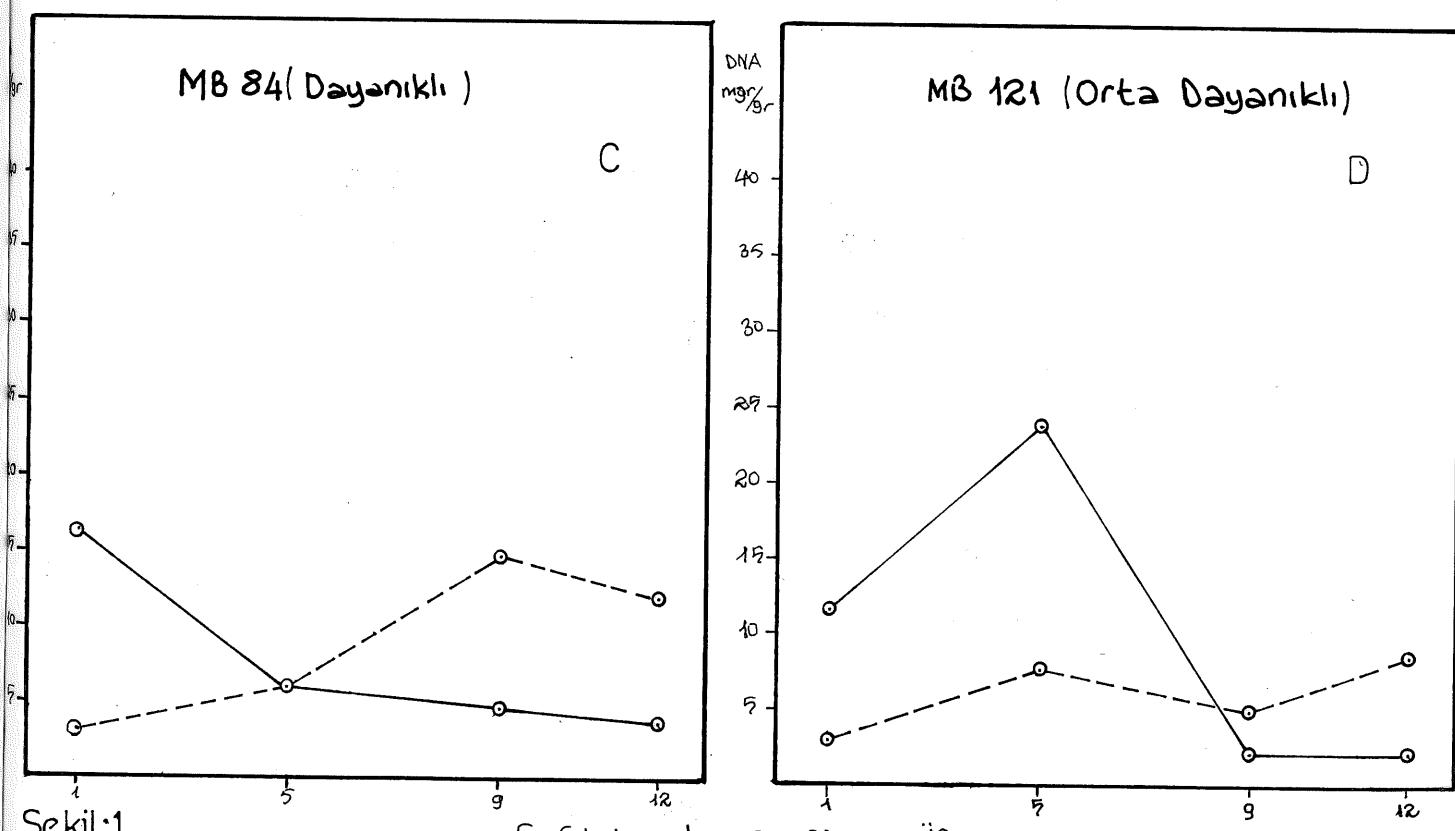
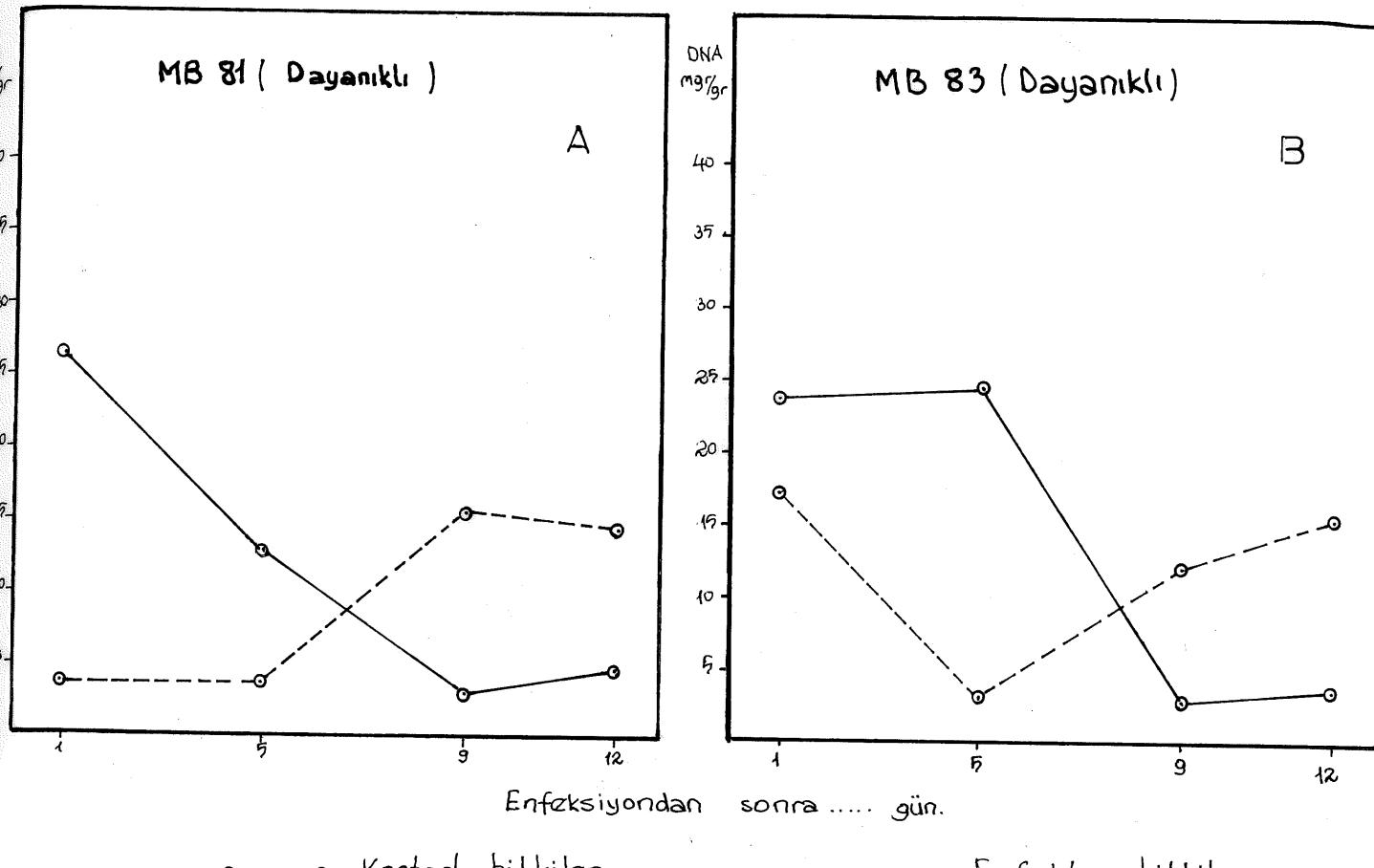
Tablo IV: *Puccinia graminis var. tritic* ile enfekte bazı buğday çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde serbest amino asit azotu miktarları. (mg/g kuru yaprak)

Kontrol (sağlıklılı) bitkiler

Bugday çeşitleri	Enfeksiyondan sonra..... gün			
	1	5	9	12
Dayanıklı				
MB 81	0.047	0.035	0.047	0.038
MB 83	0.048	0.029	0.030	0.039
MB 84	0.045	0.045	0.043	0.016
Orta dayanıklı				
MB 121	0.114	0.038	0.025	0.020
Hassas				
Little Club	0.153	0.030	0.037	0.029
Michigan Amber	0.194	0.032	0.037	0.038
Cheyenne	0.138	0.019	0.035	0.038

Enfekte (paslı) bitkiler

Bugday çeşitleri	Enfeksiyondan sonra..... gün			
	1	5	9	12
Dayanıklı				
MB 81	0.55	0.895	0.09	0.285
MB 83	0.63	0.81	0.11	0.22
MB 84	1.29	1.245	0.15	0.155
Orta dayanıklı				
MB 121	0.685	0.46	0.035	0.12
Hassas				
Little Club	0.98	0.18	0.19	0.15
Michigan Amber	1.345	0.19	0.53	0.64
Cheyenne	1.045	0.12	0.185	0.22



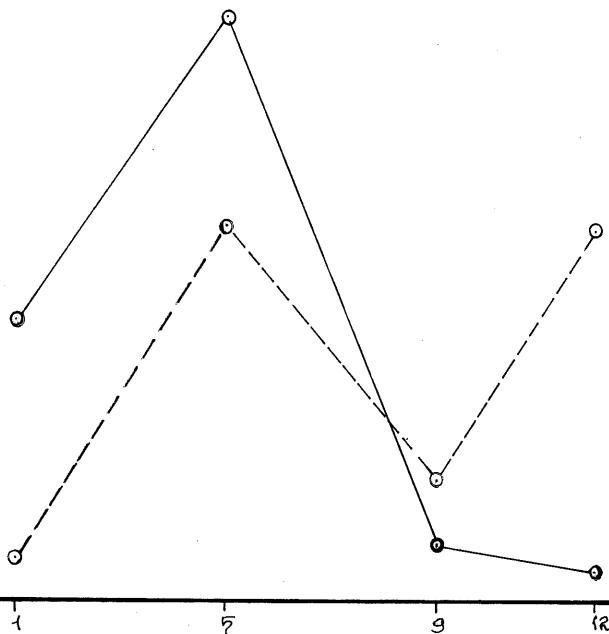
Şekil:1

Puccinia graminis var. tritici ile enfekte bazı dayanıklı ve orta dayanıklı bugday çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde DNA miktarları (mg/g kuru yaprak)

Little Club

(Hassas)

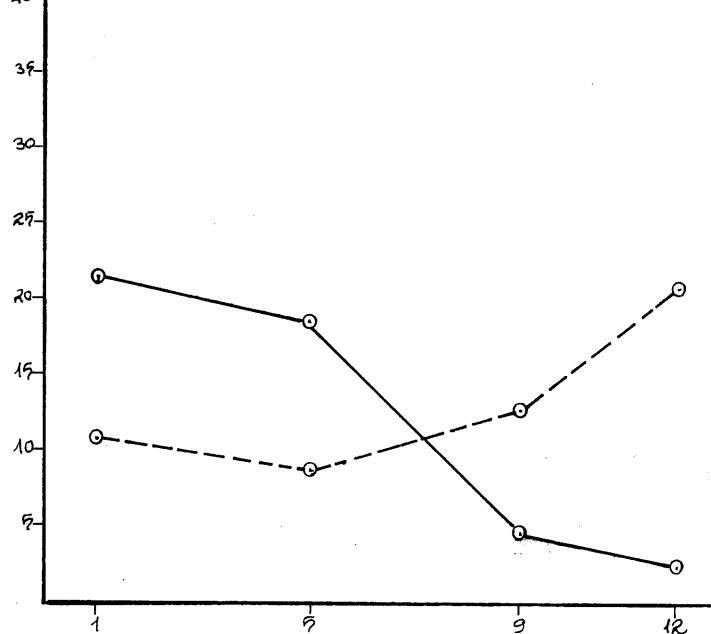
A



Michigan Amber

(Hassas)

B

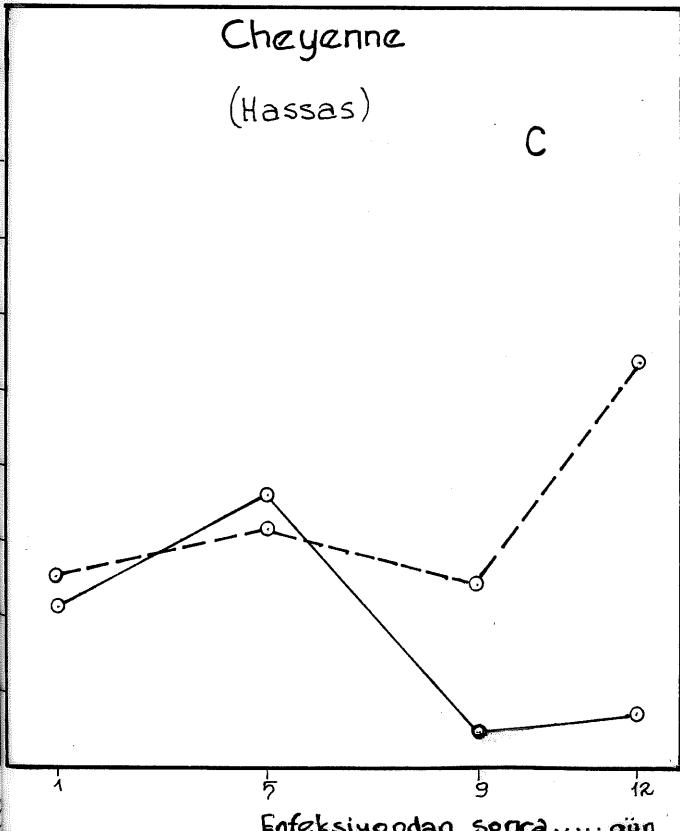


Enfeksiyondan sonra gün.

Cheyenne

(Hassas)

C



○---○ Kontrol

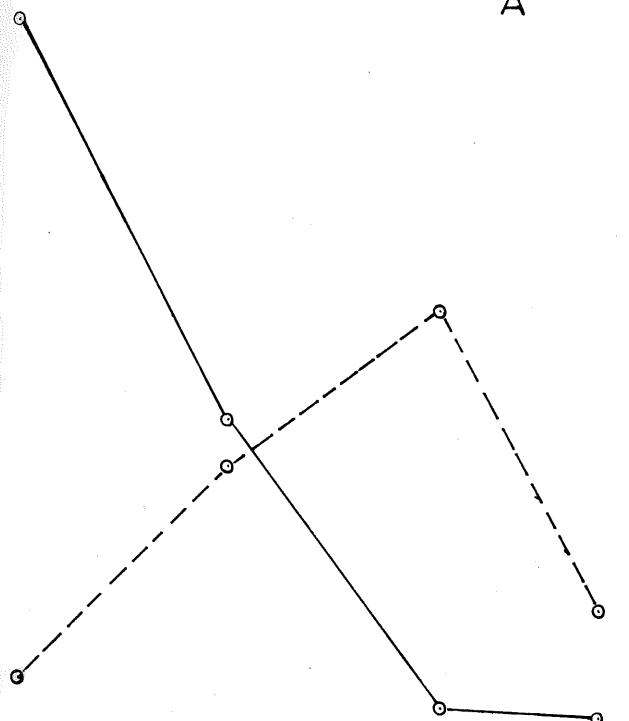
○—○ Enfekte

Sekil: 2

Puccinia graminis var. tritici ile enfekte bazı hassas buğday çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde DNA miktarları (mgr/gr. kuru yaprak)

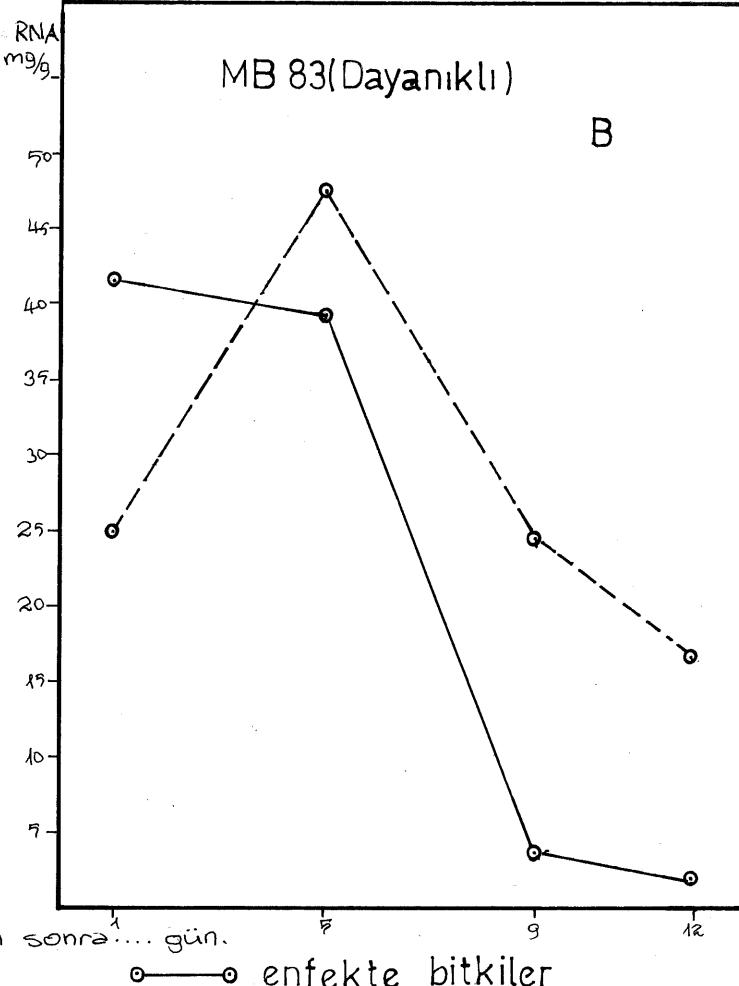
MB 81 (Dayanıklı)

A



MB 83 (Dayanıklı)

B

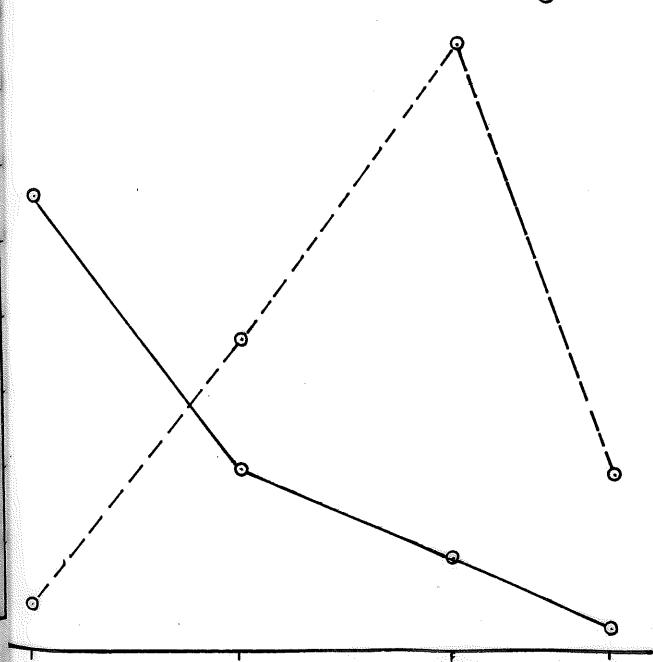


○---○ kontrol bitkiler

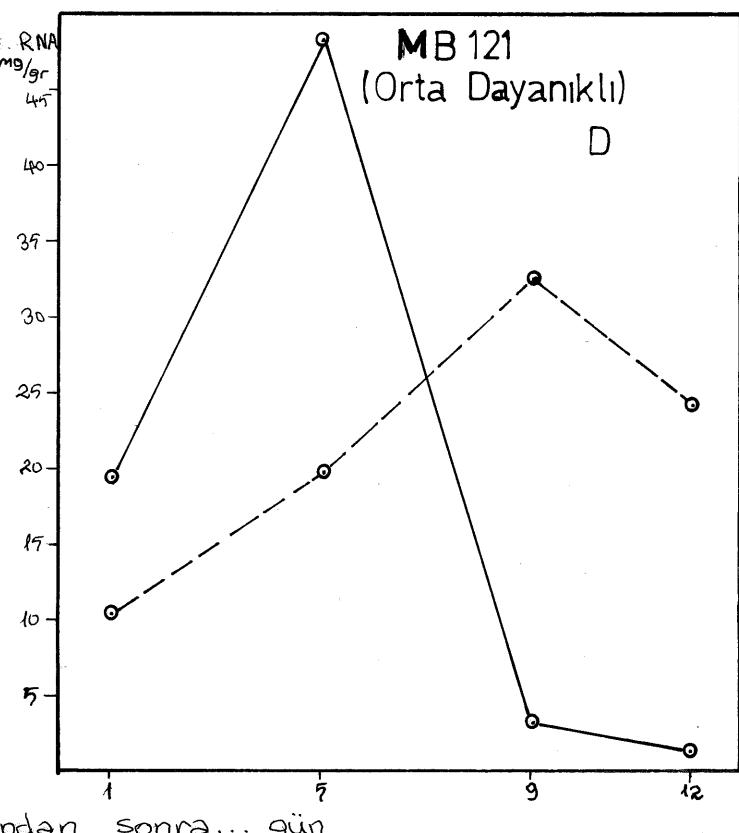
○—○ enfekte bitkiler

MB 84 (Dayanıklı)

C

MB 121
(Orta Dayanıklı)

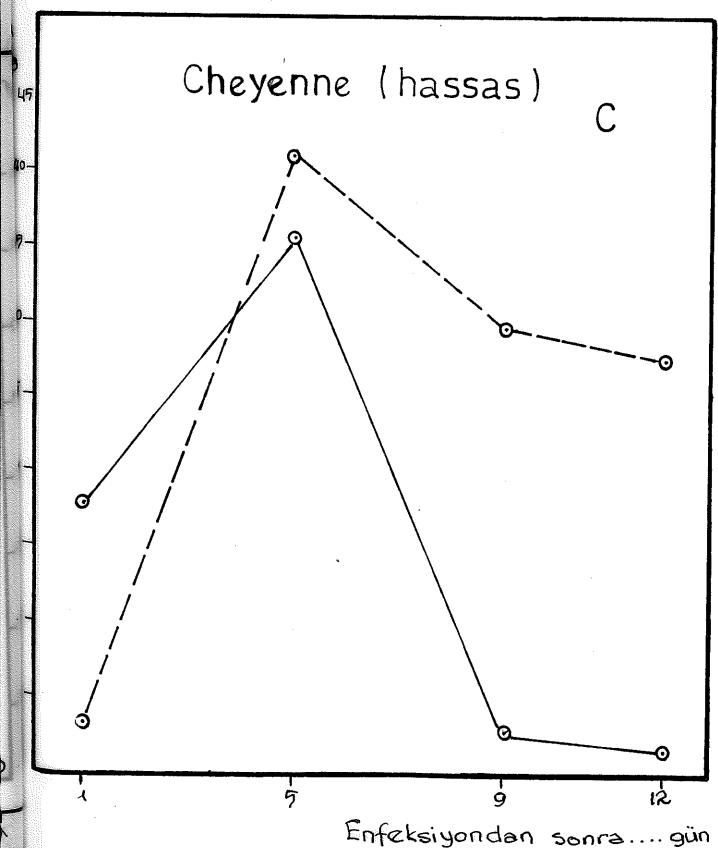
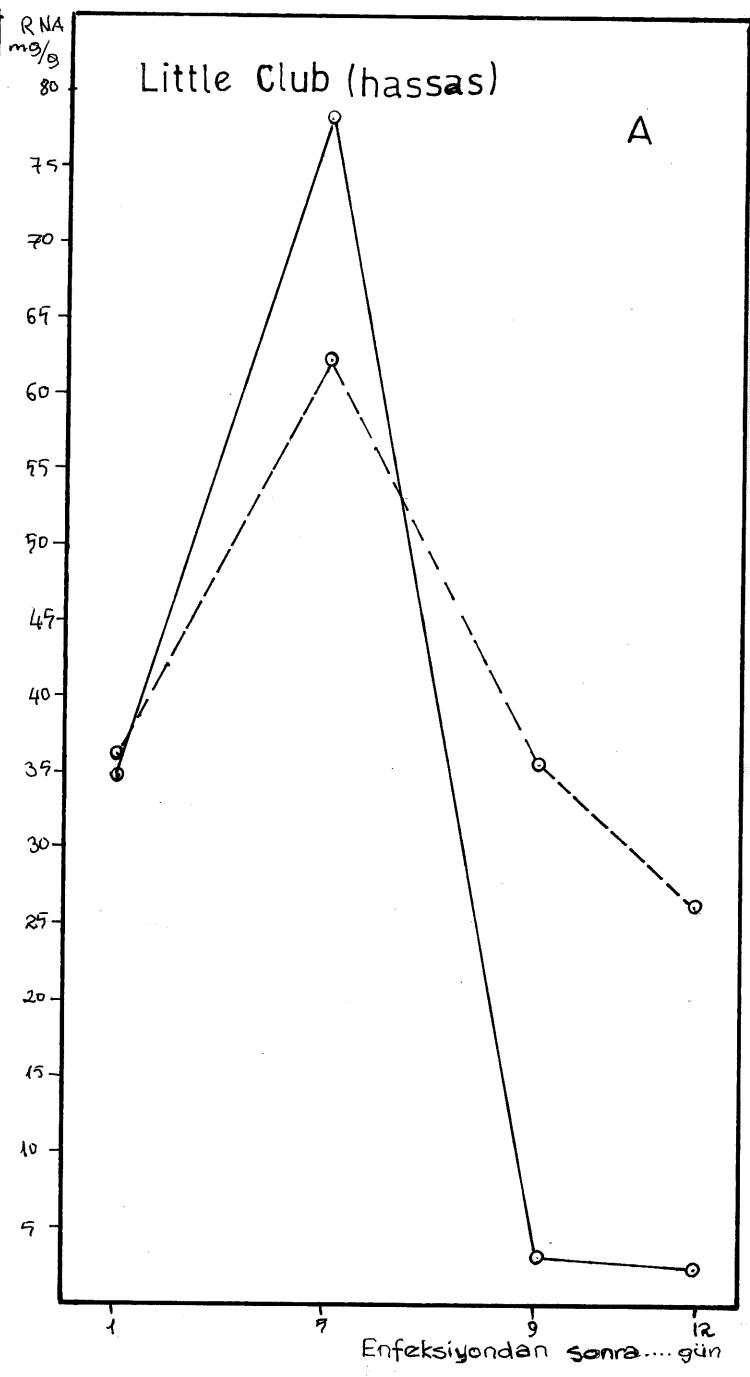
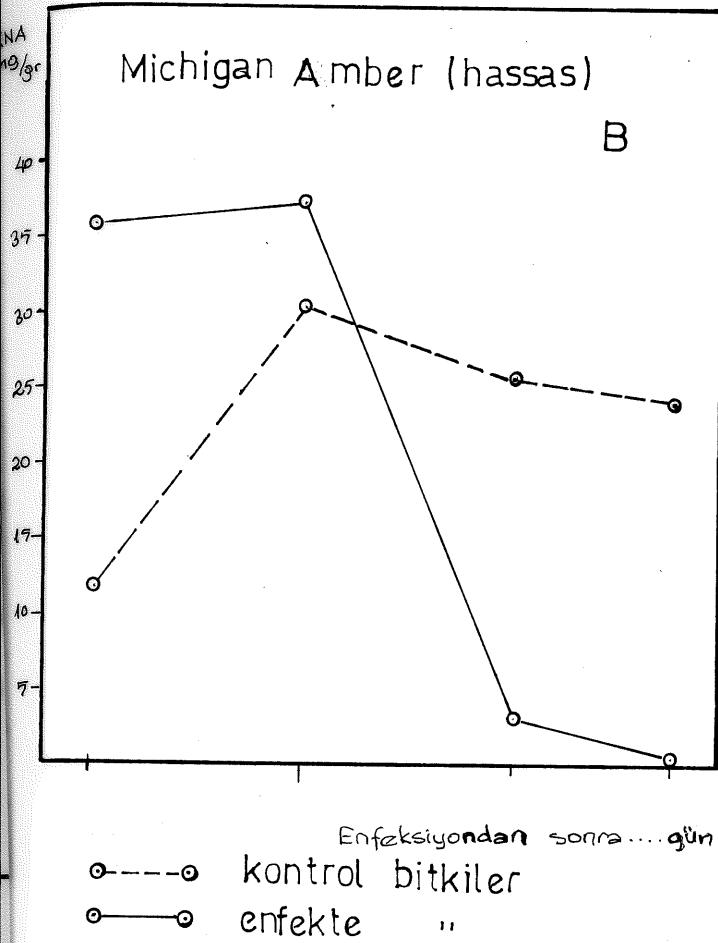
D



Enfeksiyondan sonra... gün

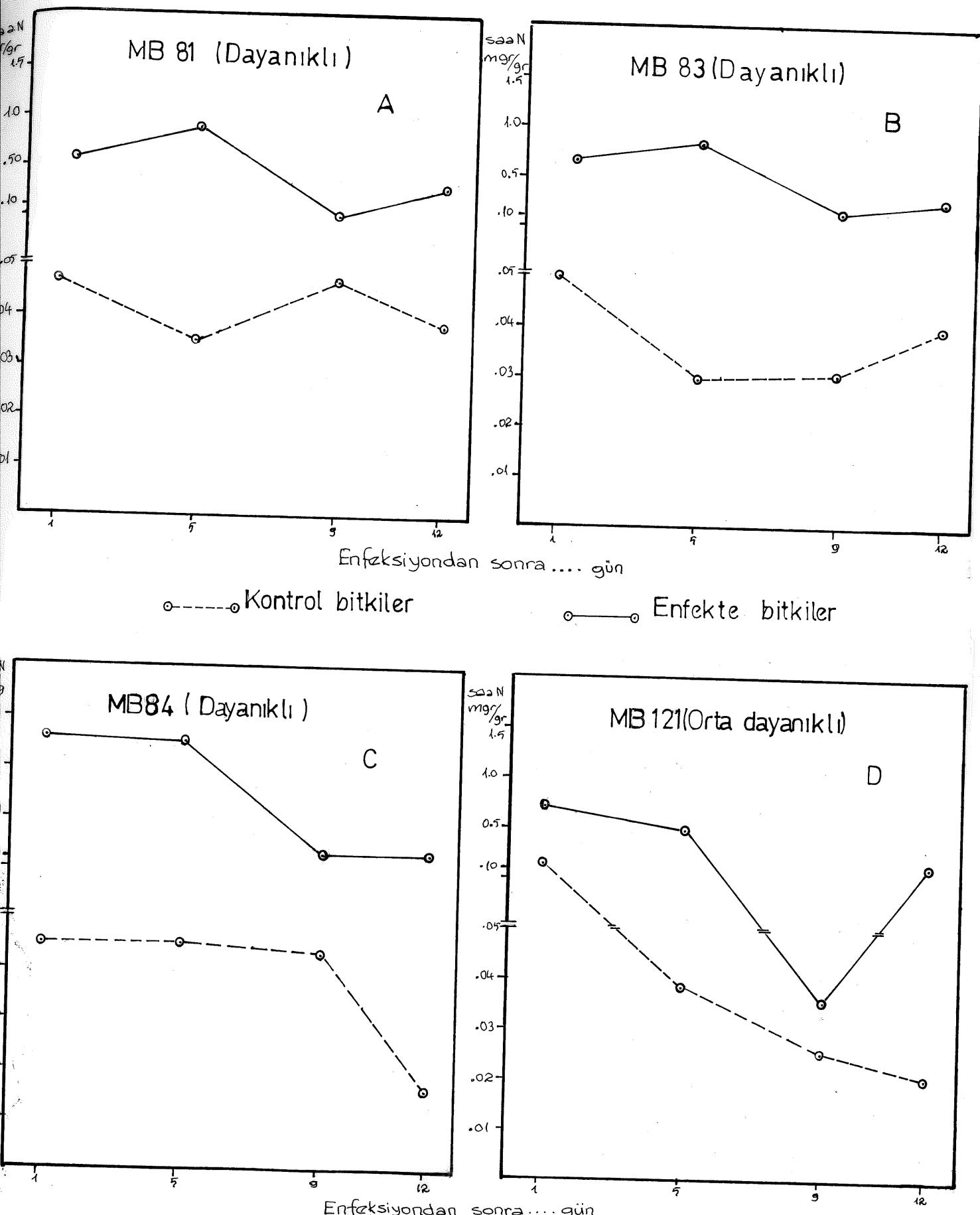
Şekil: 3

Uccinia graminis var. tritici ile enfekte bazı dayanıklı ve orta dayanıklı buğday çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde RNA miktarları (mg/g kuru yap.)



Sekil : 4

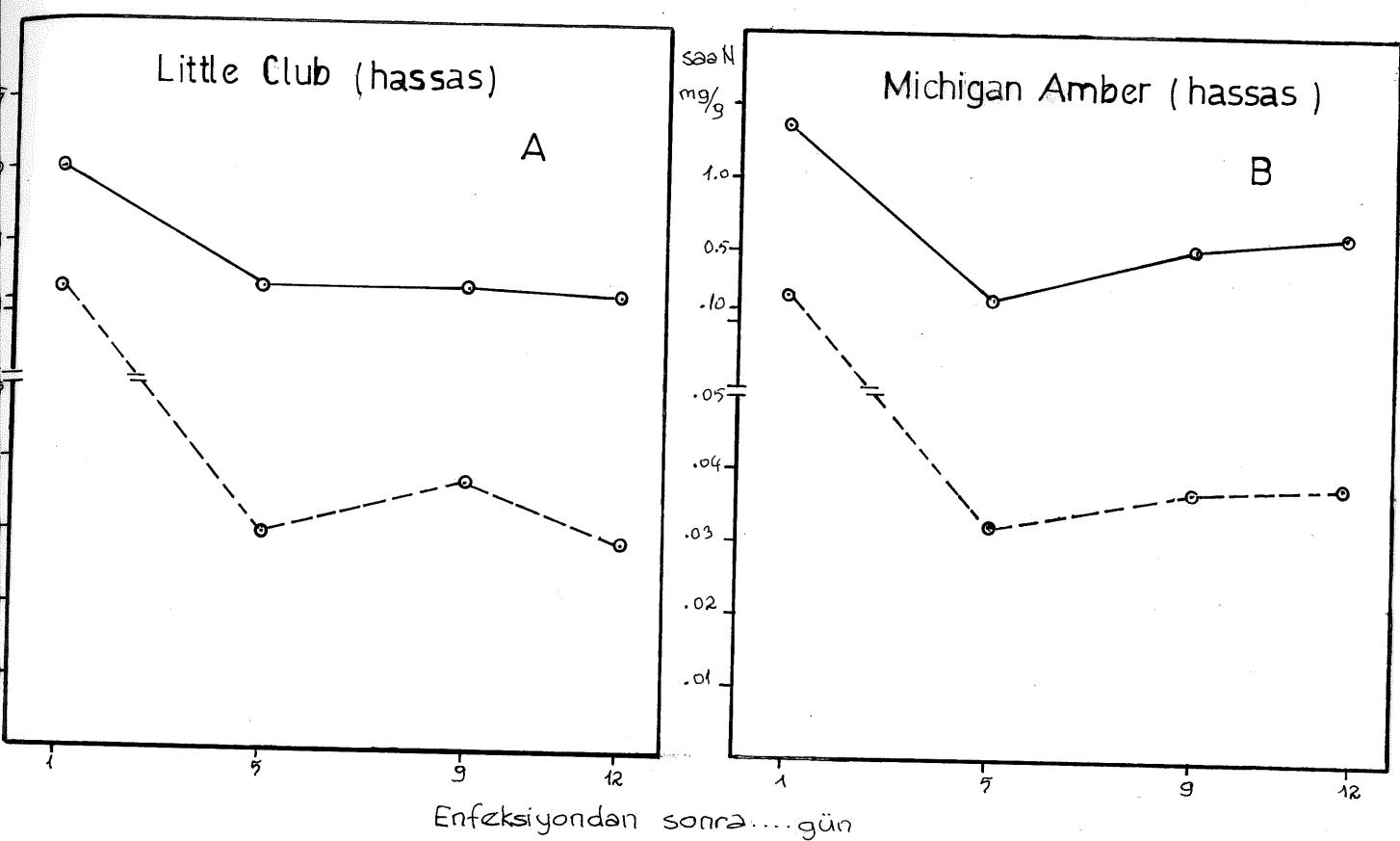
Puccinia graminis var. tritici ile enfekte hassas buğday çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde RNA miktarları (mg/g kuru yaprak)



Şekil: 5

Puccinia graminis var. tritici ile enfekte bazı dayanıklı ve orta dayanıklı buğday çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde serbest amino asit N'u miktarları.

(mg/g kuru yaprak)



○---○ Kontrol bitkiler
○—○ Enfekte "

Şekil:6

Puccinia graminis var. tritici ile enfekte bazı hassas buğday çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde serbest amino asit N'u miktarları (mg/gr kuru yaprak)

MB 121 orta dayanıklı buğday çeşidinde enfeksiyon sonrası 1. günde DNA değerleri kontrollerin 3.8 katıdır. 5. günde enfekte ve kontrol gruplarında artış olursada bu oran sabit kalır. 9. günde enfekte bitki değerleri hızlı bir şekilde düşer ve kontrol değerlerinin altına iner. (kontrollerden 2 kez daha düşük) 12. günde enfekte grup değerleri değişmeden kalırken, kontrollerde bir miktar artış gözlendi. (Şekil 1D)

Hassas Little Club çeşidinde inokulasyon sonrası 1. günde DNA miktarları kontrollerden yüksektir. (yaklaşık 6.3 katı) 5. günde her iki gruptada artış görülürken, 9. günde enfekte grup hızlı bir düşüşle kontrol değerlerinin altına iner. (kontrollerden 2 kez düşük) 12. günde kontrol değerleri yükselirken enfektelerde düşme gözlendi. (Şekil 2A)

Hassas Michigan Amber çeşidinde inokulasyondan 1 gün sonra kontrol değerleri enfektelerin yaklaşık yarısı kadardır. 5. günde her iki gruptada hafif bir düşme olur, 9. günde enfekte değerleri kontrollerin altına iner. (kontrollerden yaklaşık 2.5 kez düşük) 12. günde kontrol değerleri artarken enfekte değerleri düşmeye devam eder. (Şekil 2B)

Hassas buğday çeşidi Cheyenne'de ise enfeksiyon sonrası 1. günde diğerlerinden farklı olarak kontrol değerlerinin çok az altında yer alan enfekte bitki değerleri, 5. günde yükserek kontrollerin üstüne çıkarsada, her iki günde de değerler birbirine yakındır. 9. günde enfekte bitki değerleri hızlı bir düşüşle kontrol grubunun altında değerler verir. (kontrollerden 5 kez düşük) 12. günde kontrol grubundaki artış enfekte

bitki değerlerinden daha fazladır. (Şekil 2C)

Kısaca özetlersek grafiklerdende görülebileceği gibi dayanıklı konak-patojen (Şekil 1A, 1B, 1C) ve hassas konak-patojen (Şekil 2A, 2B, 2C) birimlerinde enfeksiyon sonrası ilk gün DNA değerleri daha yüksektir. Bu iki grup arasındaki en büyük fark 5. günde ortaya çıkar. Dayanıklı konak-patojen biriminde DNA değerleri sürekli düşerek (MB 83 çeşidinde çok az bir artış vardır.) 12.8-24.4-6 mg/g gibi değerler verir. Hassas konak-patojen biriminde (Michigan Amber çeşidinde hafif bir düşüş gözlandı) sürekli bir artış vardır ve 38.6-18.6-18 mg/g gibi değerler verir. 9. günde dayanıklı ve hassas konak-patojen birimlerinde hızlı bir düşüş gözlandı. Her iki grupta da değerler kontrollerin altına düşer. Orta dayanıklı çeşit MB 121 hassas çeşitlere benzer bir gelişim seyri izler. 5. günde 23.9 mg/g'a ulaşan artış, 9. günde hızlı bir düşüşle kontrollerin altına iner. (Şekil 1D)

2- RNA miktarlarındaki değişimler:

RNA değerleri Tablo III te kontrol (sağlıklı) ve enfekte (paslı) bitkiler için verilmiştir.

MB 81 dayanıklı buğday çeşidinde *Puccinia graminis* var. tritici enfeksiyonundan sonra 1. günde enfekte bitkilerin RNA miktarı kontrollere göre çok yüksektir. (kontrollerin yaklaşık 7 katı) 5. güne doğru kontrol bitkilerinin RNA değerleri yükselirken, enfekte bitkilerde ise düşüş gözlenir ve birbirleme yakının değerlere ulaşırlar. Kontrol değerleri 9. günde yükselirken, enfekte bitki değerleri düşer. (enfektelerin yaklaşık

6.3 katı) 12. günde hem enfekte, hemde kontrol değerlerinde düşme olur, değerler birbirine yaklaşır. (Şekil 3A)

Dayanıklı çeşit MB 83'te inokulasyondan sonra 1. günde enfekte bitkilerin RNA değerleri kontrollerden 1.6 kat fazladır. 5. günde kontrol grubu maksimum değerine ulaşırken enfekteler düşmeye devam eder. 9. günde kontrol değerlerinde azalma görülsede, genede enfektelerden yüksektir. (enfektelerin yaklaşık 6.5 katı) 12. günde kontrol değerleri düşerken enfekte değerleri hafifçe yükselir. (Şekil 3B)

Dayanıklı çeşit MB 84 bitkisinde inokulasyon sonrası 1. günde enfekte değerleri kontrollerden yüksektir. (yaklaşık 8.3 katı) Enfekte değerleri düşerken, kontroller 9. güne kadar artar. (enfektelerin yaklaşık 6.4 katı) 12. günde kontrolerde hızlı, enfektelerde ise yavaş bir düşme gözlandı. (Şekil 3C)

Orta dayanıklı çeşit MB 121 de inokulasyon sonrası 1. günde RNA değerleri enfekte bitkide kontrollerin yaklaşık 1.8 katıdır. Kontrol ve enfekte değerleri 5. güne kadar artmaya devam eder. Enfekte bitkiler maksimum değerine ulaşır. (kontrollerin yaklaşık 2.5 katı) 9. günde kontrol değerleri artmaya devam ederken enfekte değerleri düşer. (kontrollerden yaklaşık 10 kez daha düşük) 12. günde hem enfekte, hemde kontrol değerlerinde düşme olur. (Şekil 3D)

Hassas çeşit Little Club'in Puccinia graminis var. tritici ile inokulasyondan 1 gün sonra kontrol ve enfekte bitkilerin RNA değerleri birbirine çok yakındır. 5. günde en-

fekte bitkilerdeki artış daha yüksektir. (kontrollerin yaklaşık 1.2 katı) 9. gündeki düşüş enfekte bitkilerde daha hızlıdır. (kontrollerden yaklaşık 10 kez daha düşük) 12. günde de düşme devam eder. (Şekil 4A)

Hassas çeşit Michigan Amber'de enfeksiyon sonrası 1. günde enfekte bitkilerin RNA değerleri daha yüksektir. (kontrollerin yaklaşık 3 katı) 5. günde her iki gruptada yükselme görülür ve değerler birbirine yaklaşır. 9. günde enfekte bitkilerde kontrollere göre daha hızlı bir düşüş vardır. (kontrollerden yaklaşık 8 kez daha düşük) 12. günde enfekte ve kontrol bitkilerde düşme devam eder. (Şekil 4B)

Hassas çeşit Cheyenne'de inokulasyondan sonra 1. gün enfekte bitki değerleri kontrollerden yüksek olmasına rağmen 5. günde kontrol değerlerinin altına düşer, 9. günde ise kontrollerden yaklaşık 10 kez daha düşüktür. 12. günde her iki gruptada hafif bir düşme gözlenir. (Şekil 4C)

Grafiklerdende görülebileceği gibi dayanıklı konak-patojen birimlerinde (Şekil 3A, 3B, 3C) enfeksiyondan sonra 1. gün RNA değerleri kontrollere göre daha yüksektir. Bu oran hassas konak-patojen birimlerinde (Şekil 4A, 4B, 4C) daha düşüktür. (Little Club'da bu değer kontrollerin altında yer alır.) Bu iki grup arasındaki en büyük fark 5. günde ortaya çıkar. Dayanıklı konak-patojen biriminde değerler 1 ve 12. günler arasında sürekli düşer. Hassas konak-patojen biriminde ise 5. günde önemli bir artış görülür. 78.4-37.1-35.45 mg/g gibi değerler vererek maksimuma ulaşır. (Yalnız Cheyenne kontrol değer-

lerinin altında kalır) Bu sırada dayanıklı çeşitler ise 23.9-39.4-12.07 mg/g gibi değerler verir. 9. günde her iki grupta hızlı bir düşüşle kontrollerin altına inerler. Bu durum 12. günde de aynı şekilde devam eder. Orta dayanıklı çeşit MB 121 hassas çeşitlere benzer bir gelişim seyri izler. 5. günde enfekte bitkiler maksimum değerine (48.36 mg/g) ulaşır. 9. güne doğru hızlı bir düşüş gösterir. (3.07 mg/g) (Şekil 3D)

3- Serbest amino asit azotu miktarlarındaki değişimler:

Serbest amino asit azotu ile ilgili değerler Tablo IV te kontrol (sağlıklı) ve enfekte (paslı) bitkiler için verilmiştir.

Dayanıklı buğday çeşitleri MB 81 ve MB 83 değerleri birbirine benzer bir gelişim gösterir. Enfeksiyondan sonra ilk gün kontrollere göre, sırası ile 11.7 ve 13.1 kat fazla olan değerler, yükselerek 5. günde sırası ile 25.5 ve 27.9 kata ulaşır. 9. günde her iki çeşitede düşme olur ve değerler kontrollere yaklaşır. (kontrollerin yaklaşık 1.9 ve 3.6 katı) 12. günde enfekte değerlerde 7.5 ve 5.6 kata varan artışlar olur. (Şekil 1A ve 1B)

MB 84 dayanıklı buğday çeşidinde ise enfeksiyondan sonra 1. günde enfekte bitki değerleri kontrollerden 28.6 kat fazladır, 5. günde bu oran 27.6 ya düşer. 9. günde diğer iki çeşide benzer hızlı bir düşüşle kontrollere yaklaşır ve oran 3.4 e düşer. 12. günde ise bu oran 9.6 ya çıkar. (Şekil 1C)

Orta dayanıklı MB 121 de enfeksiyondan sonra 1. günde

enfekte bitki değerleri kontrollere göre 6 kat fazladır. 5. günde bu oran 12 olursada 9. günde hızlı bir düşüşle 1.4 e inferior. 12. günde enfekte bitki değerleri kontrollere göre 6 kat fazladır. (Şekil 5D)

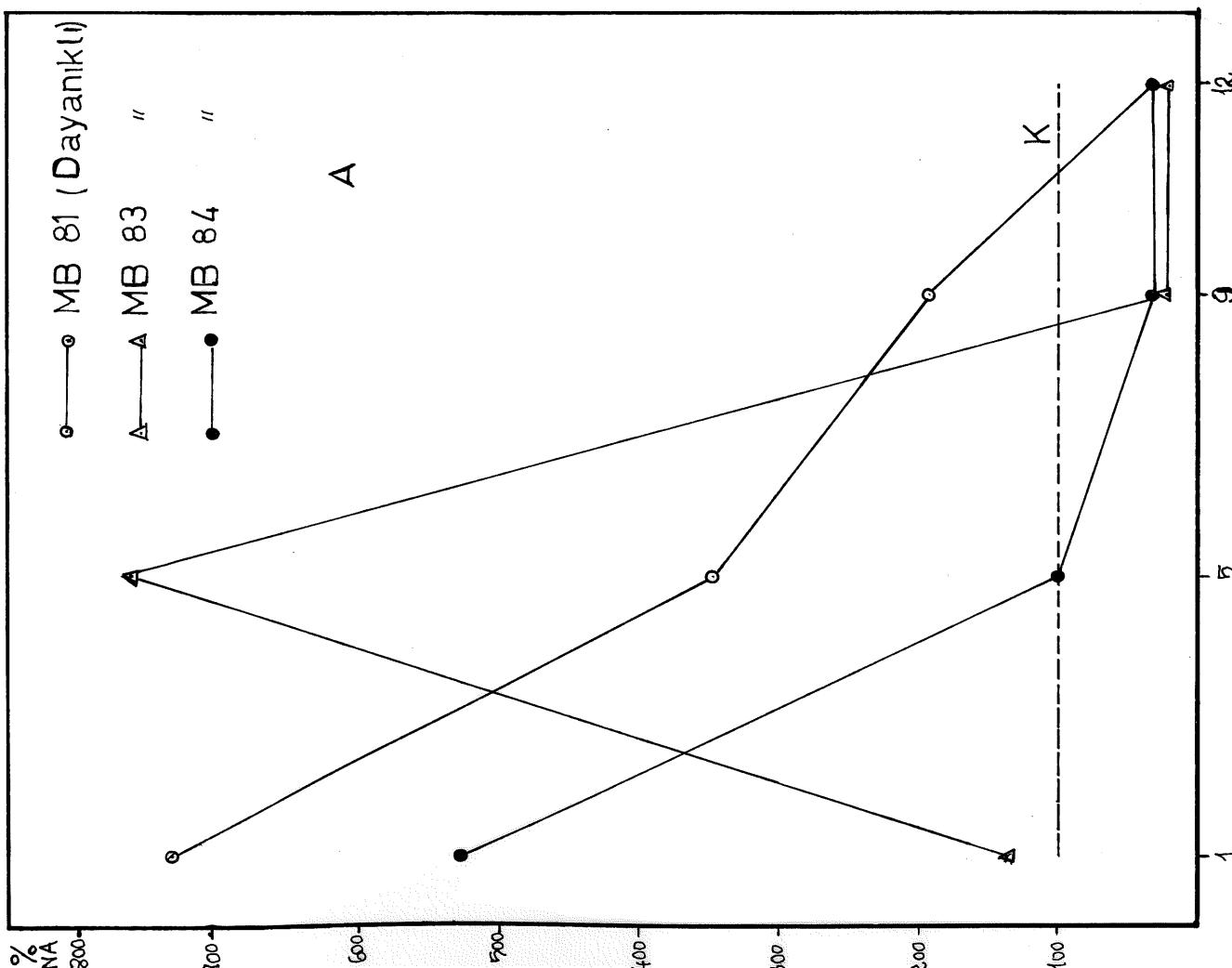
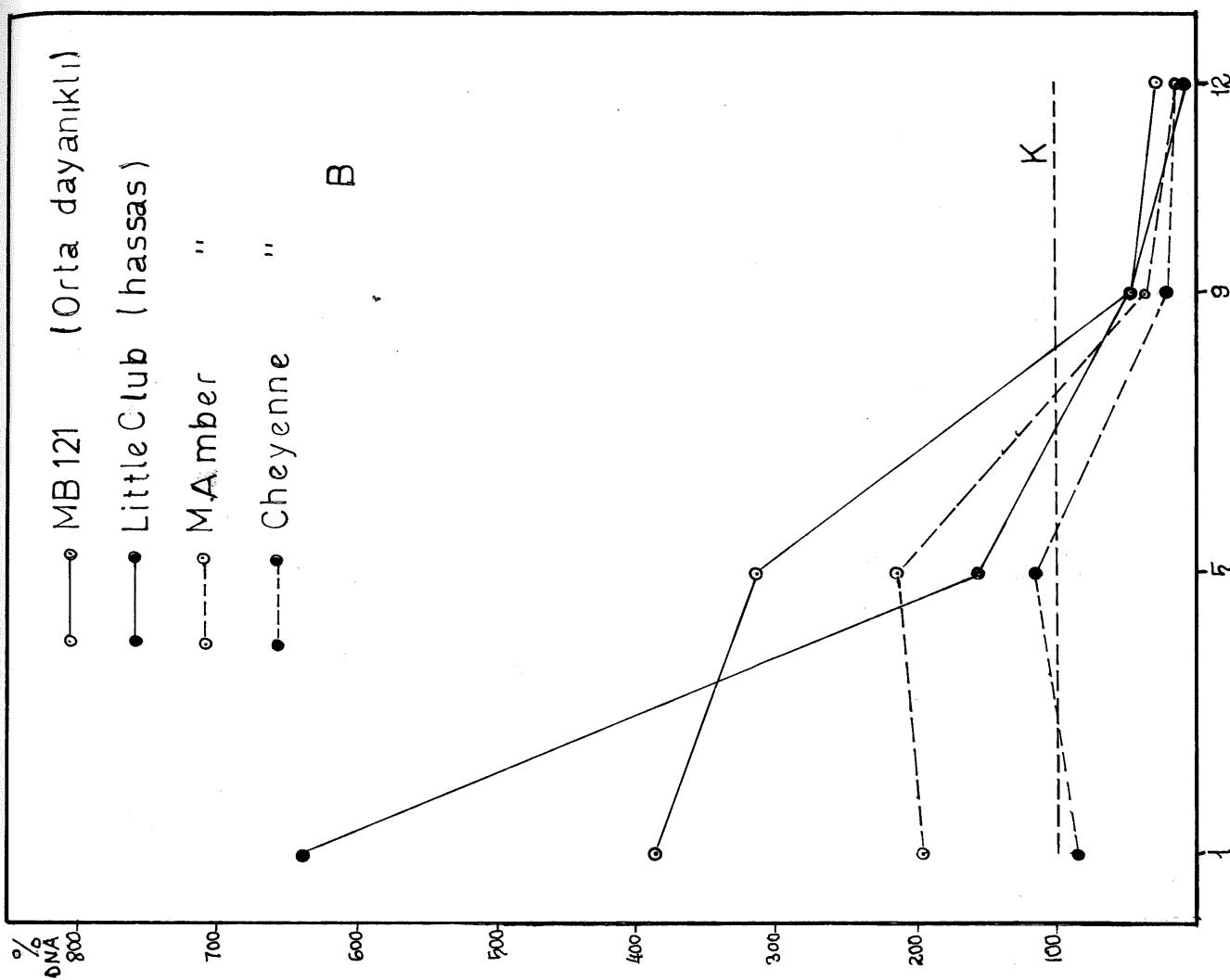
Hassas çeşitlerden Little Club'da enfeksiyon sonrası 1. günde değerler kontrollere göre 6 kat fazladır. 5. günde hızlı bir düşüş olur fakat oran sabit kalır. 9. günde enfekte bitkilerde hafif bir artış olmasına karşın, bu oran 5 e düşer. 12. günde her iki gruptada az da olsa bir düşüş gözlandı. (Şekil 6A)

Hassas çeşit Michigan Amber'de ilk günüki değerler yaklaşık 7 kat fazla olmasına rağmen 5. günde enfekte değerlerde hızlı bir düşme olur, fakat genede kontrollerden yüksektir. (yaklaşık 5.9 kat) 9. günde artan değerlerle bu oran 14.3 e çıkar. 12. günde de hafif bir şekilde artmaya devam eder. (Şekil 6B)

Hassas çeşit Cheyenne'de enfeksiyondan sonra kontrollere göre çok yüksek olan değerler (yaklaşık kontrollerin 7.5 katı) 5. güne doğru hızlı bir düşüş gösterir sadece kontrol değerlerinde gözlenen benzer bir düşüş nedeni ile, kontrollere göre 6.3 kat fazladır. Bu oran 9. günde 5.2 ye, 12. günde ise 5.7 ye düşer. (Şekil 6C)

Grafiklerdende görülebileceği gibi dayanıklı konak-patojen birimlerinde (Şekil 5A, 5B, 5C) *Puccinia graminis* var. tritici enfeksiyonundan sonra, kontrollere göre yüksek olan değerler 5. günde de artmaya devam ederek, (MB 84 te hafif bir

düşme olur.) maksimum değerine ulaşır. 9. günde hızlı bir düşüş ile kontrol değerlerine yaklaşırken 12. günde değerler önemli bir değişim göstermez. Hassas konak-patojen biriminde de enfeksiyondan sonra 1. günde kontrollere göre daha yüksek olan değerler 5. günde en düşük seviyesine ulaşırken, 9. günde tekrar artmaya başlar.(Şekil 6A, 6B, 6C) Orta dayanıklı çeşit MB 121, hassas çeşitlere benzer bir gelişim seyri izler. Farklı olarak değerlerdeki düşme 9. güne kadar devam eder. (Şekil 5D)



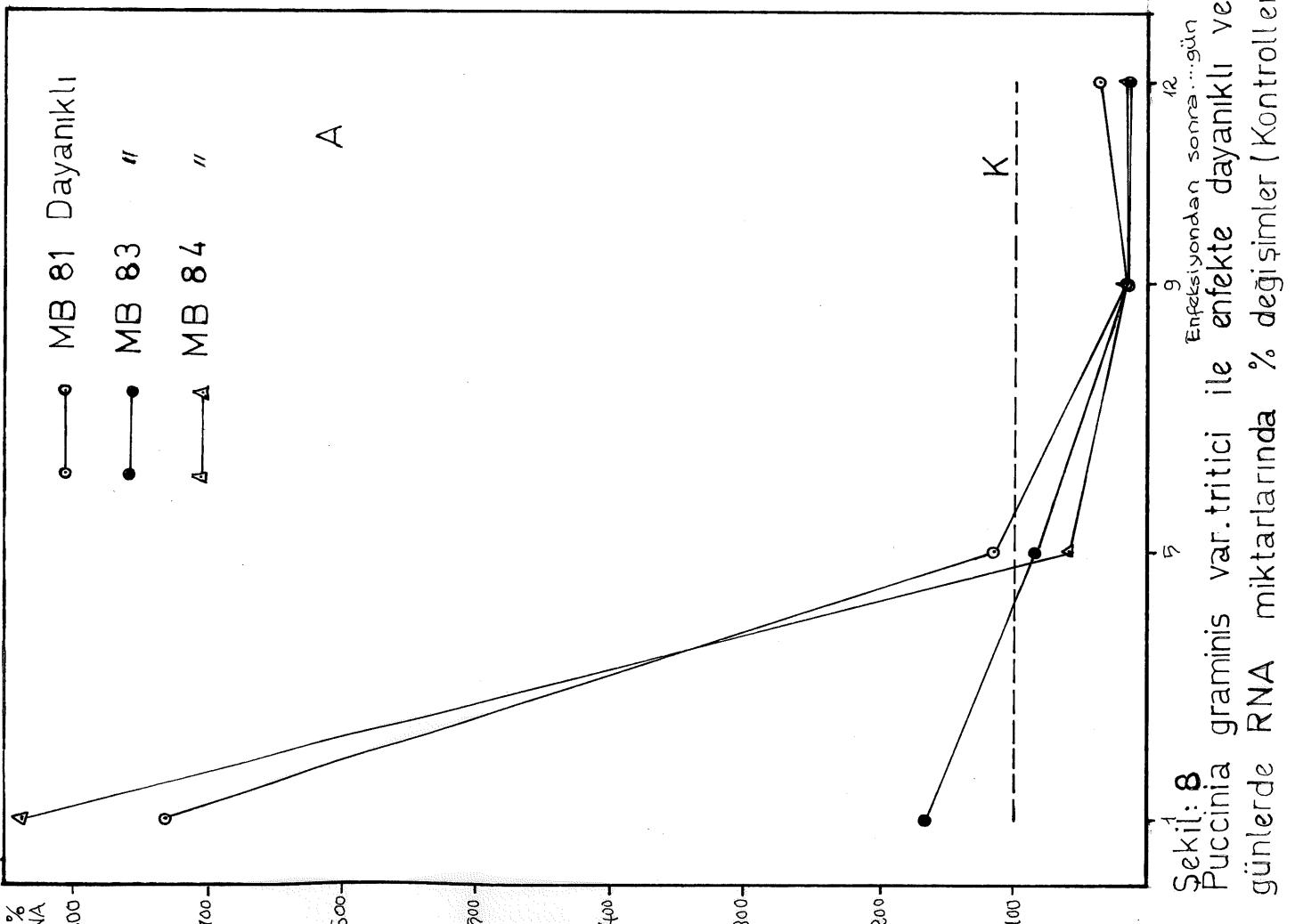
Sekil: 7 Puccinia graminis var. tritici ile enfeksiyondan sonra ... gün ki günlerde DNA miktarlarında % değişimler (kontroller 100 olarak kabul edilmişdir.)

Enfeksiyondan sonra gün

Enfeksiyondan sonra gün

Enfeksiyondan sonra gün

Enfeksiyondan sonra gün



Sekil: 8 graminis var. tritici ile enfekte dayanıklı ve hassas buğday çeşitlerinde enfeksiyondan sonra... günlerde RNA miktarlarında % değişimler (Kontroller 100 olarak kabul edilmiştir)

Enfeksiyondan sonra... gün
Enfeksiyondan sonra... gün
Enfeksiyondan sonra... gün
Enfeksiyondan sonra... gün

TARTIŞMA

Şonuçlardanda anlaşılacığı gibi genel bir yorum yapmak gerekirse, dayanıklı buğday çeşitlerinde enfeksiyon sonrası DNA miktarının düşüşünü buna karşın hassas çeşitlerde enfeksiyon sonrası 5. güne kadar DNA miktarındaki artışı, 9 ile 12. gün arasındaki düşüş izler. İstisna olarak söyleyebileceğimiz bir durumda MB 81 dayanıklı çeşidinde enfeksiyon sonrası 9. güne kadar düşüşü, 9 ile 12. gün arasındaki çok az bir yükselme izlemektedir. Aynı şekilde Michigan Amber hassas çeşidinde enfeksiyon sonrası sürekli artışı izledik.

Allen (1923) tarafından yapılan çalışmada, pas enfekte buğday yapraklarında, konak mezofil hücrelerindeki çekirdek ve çekirdekçiklerinin enfeksiyonun erken dönemlerinde, bozulmadan önce, büyüdüğü rapor edilmiştir. Çekirdekteki bu büyümeyi enfeksiyon sonrası DNA miktarında artış olarak gözlemek mümkün olabilir. Çalışmalarımızda hassas Little Club ve Cheyne'ne çeşitlerinde 5. güne kadar DNA miktarındaki yükselmeyi, enfeksiyon sonrasında mesofil hücre çekirdeklerinin büyümesine bağlı olarak açıklayabiliriz.

Whitney ve arkadaşlarının çalışmalarında hassas Little Club enfeksiyonunun 5. gününde şişen hücre çekirdeklerinin RNA miktarında, sağlıklı kontrollerinkine göre 1 kat artış test bit edilmiş ve DNA miktarında hafif bir düşme (~~herhangi bir düşme~~) herhangi bir değişiklik yoktur şeklinde değerlendirilmiştir. Boyutları artan çekirdeklerde enfeksiyonun 5. gününde yükselen RNA miktarı daha sonra pas püstüllerinin giderek büyümesi ile birlikte zamanla yeniden azalmaktadır. Buna karşılık patojenin

yaprak üstü hifleri çok daha yüksek bir RNA miktarına sahip oldukları kanıtlanmış olup, enfeksiyonun son döneminde çekirdek parçalanması ise büyük oranda DNA kaybına yol açmıştır. Dayanıklı buğday çeşidi Khapli üzerinde yürütülen incelemelerde değişimlerin hassas Little Club'inkine benzer bir gelişim seyri izledikleri, ancak çok kısa bir zaman içinde olup bittikleri tesbit edilmiştir. (Whitney, Shaw ve Naylor, 1962)

Shaw ve grubunun hassas Little Club ve dayanıklı Khapli buğdaylarında yaptıkları çalışmalarda enfeksiyondan 6 gün sonra kontrol yapraklarındaki RNA kaybını yaprakların yaşlanmasına bağlamışlardır. Bu kaybı enfekte dokularda görememişlerdir. Bunu daha sonra enfekte yapraklarda artan solunum oranı ile paralel devam eden RNA miktarındaki artışın takip ettiğini tesbit etmişlerdir. (Quick ve Shaw, 1964)

Bizim çalışmalarımızda hassas Michigan Amber, Cheyenne ve Little Club hassas bitkilerinde Shaw ve Quick'in çalışmalarını destekler şekilde sonuçlar elde edilmiştir. Enfsiyondan sonraki 5 gün içerisinde sürekli bir RNA artışı gözlenmiştir.

Quick ve Shaw (1964) daha sonra enfeksiyonu takip eden DNA miktarında çok az bir değişim olduğunu ve dayanıklı buğday çeşitlerinde RNA miktarının artan solunum oranı ile birlikte olmadığını göstermişlerdir. Literatür taramalarından elde edilen bilgiler aynı konak-patojen kombinasyonunda daha önce yapılan çalışmaları desteklediğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda $^{32}P_i$ dokuya verilmiş ve RNA'nın spesifik aktivitesi kimyasal ekstraksiyonlarla hesaplanmıştır. (Rohringer ve Heitefuss, 1961)

RNA'nın spesifik aktivitesinde olan yüksek artışlar enfeksiyondan 4-5 gün sonra, ilk semptomların olduğu zamanda tesbit edilmiştir. Fakat 7 gün sonra RNA spesifik aktiviteleri kontrollerden çok az farklılık göstermişdir.

Çalışmalarımızda MBL21 orta dayanıklı, hassas Michigan Amber, Cheyenne ve Little Club çeşitlerinde enfeksiyonun ^{5.} ~~gündünde~~ değerlerin maksimuma ulaşığı gözlemlendi. Bu sonuçlarda Rohringer ve Heitefuss'un (1961) bulgularını destekler şeilderir.

Millerd ve Scott (1963) külleme enfeksiyonlarında, enfekte yapraklarda enfeksiyondan sonraki 2. günde RNA seviyelerinde önemli artışlar buldular. Bu çalışmalarında, kontrol yaprak seviyelerinin üzerinde maksimum artış, sporulasyon safhasındaki fungusun gelişimi ile aynı döneme rastladığı bulunmuştur. Bundan sonra RNA miktarının küllemeli yapraklarda hızla düşüğünde rapor edilmiştir. Benzer bir çalışma Malca ve Plumb (1968) tarafından da yapılmıştır. Hem pas, hemde külleme enfeksiyonlarında RNA sentezindeki artış ile konak patojen kompleksinde symptom oluşumu arasında bir ilişki bulunmuştur.

Bu bulguları yorumlarken göz önünde tutulması gereken bir çok komplikasyonlar vardır. Bunlardan biri fungusun yüksek moleküller ağırlıkta polifosfataz formlarında, fosfataz biriktirmesidir. Bu tip moleküller nükleik asitlere bağlanma veya birleşme eğilimindedir. (Wong ve Mancini, 1966; Bennet ve Scott 1971b) Nükleik asitlerin DNA-P veya RNA-P olarak hesaplanması enfekte dokuda üst düzeyde bir nükleik asit miktarı hesaplanmasıına neden olur. Aynı problem $^{32}P_i$ uygulamasında olabilir ve

enfekte dokularda, kontrollere göre polifosfatazlara daha çok $^{32}P_i$ bağlanması olur. (Wolf, 1968)

Düger bir ciddi problemde rapor edilen RNA sentezi-nin orijini konusudur. Artışın fungusun veya konak nükleik asitinden mi, yoksa her ikisinden birlikte mi olduğunu Millerd ve Scott (1963) küllemeli arpa yapraklarında araştırmışlar ve RNA sentezindeki artışın çoğulukla konak RNA ya ait olduğunu göstermişlerdir.

Daha önceden bahsedildiği gibi Whitney ve grubunun (1962) buğday pas sisteminde yaptıkları çalışmada konak DNA miktarının inokulasyondan sonraki günlerde değişmeden kaldığını, hastalığın ileri dönemlerinde % 60 azalma olduğunu göstermişlerdir. Halbuki konak çekirdeğinin RNA miktarı kontrollerle karşılaşıldığında, enfeksiyondan 6 gün sonra 2 katına çıkar ve püstül boyutları arttıkça düşer. Bhattacharya ve grubunun (1965) çalışmaları bu konudaki bulguları kuvvetlendirdi. ve konak çekirdek RNA sindaki, enfeksiyondan sadece 48 saat sonra ortaya çıkan önemli artışların, 6. günde maksimum değerine ulaşlığını ve daha sonra düşüğünü gösterdi. Daha önceki kimyasal bulgulara ters olarak çekirdek RNA miktarındaki artışlar dirençli çeşitlerin mezofil hücrelerinde bulunmuştur. Buna ek olarak enfekte buğday hücrelerinde çekirdek histonlarında önemli düşüşler gözlenmiştir. (Bhattacharya ve Shaw, 1967) Hassas buğdayın enfeksiyonundan hemen sonra konak çekirdek RNA sindaki artışın, histon değişimleri ile beraber olduğu gösterilmiştir. Bu da gen aktivite değişimlerini yan-

sıtabilir.

Chacroworty ve Shaw'ın (1971) çok yakın zamandaki çalışmalarında keten kotiledonlarının Melampsora lini ile enfeksiyonundan sonra 48 saat içinde RNA sentezi oranında belirgin bir artış olur. RNA miktarında fark edilir net bir değişim olmasada, RNA sentezindeki bu artış konağa aittir, çünkü 48 saat için pas fungusunun gelişimi sınırlandırılmıştır, yeni sentezlenmiş RNA baz kompozisyonu parazitten çok konağınkini yansıtır. Kısaca özetlersek pas ve külleme ile enfekte bitkilerin total RNA miktarı kontrollere göre daha fazladır. Bu fark bazı boyutlarda abartılmış olabilir. Çalışanlar genellikle yaşılanmaya başlamış taze dokular kullanmışlardır. Bu yüzden RNA miktarında meydana gelen bu artış, yaşılanmadan dolayı azalan RNA miktarını maskeler görünümdedir. (Heitefuss, 1965)

Bazı biyokimyasal ve sitolojik bulgular konak RNA sentezinde dayanıklı ve hassas bileşimlerde ^{elde edilen deşifreler} olduğu fikrini veriyorsada, bunların basit ekstraksiyon teknikleri ile hesaplanması imkansızdır. Konak RNA sentezindeki artışın gen ekspresyonundaki değişimlerden sonuçlandığı söylenebilir. O zaman bu değişimler enfekte konak dokudaki metabolizma yollarının değişimi veya dayanıklılığı oluşturan yeni metabolik yolların başlamasından sorumludur. (Callow, 1976)

Çalışmalarımızda dayanıklı MB 81, MB 83 ve MB 84 çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde, her üçünde de RNA miktarının sürekli azlığı gözlenmiştir. Buna karşın kontrol gruplarında MB 81 ve MB 84 te 9. güne kadar RNA artışı, bunu

takip eden günlerde de RNA düşüşü izlemektedir. Daha önceki çalışmalarlardan bilindiği gibi, çekirdek boyutlarında bir artış ve bunu takip eden çekirdek bozulması, enfekte dayanıklı konak hücrelerinde de olur, fakat bütün bu olaylar hassas konak hücrelerine göre çok kısa bir sürede olur ve pas gelişimi engeller. (Rohringer ve Heitefuss, 1961) Bununla beraber MB 81, MB 83 ve MB84 çeşitlerindeki enfeksiyondan sonra RNA miktarındaki düşüşü yaşlanması doğal sonucu olarak yorumlayabiliriz.

Enfekte dayanıklı bitkilerdeki RNA oranındaki ilk günden başlayan düşüse karşılık, kontrol bitkilerinde ilk günlerde görülen artışı şu şekilde yorumlayabiliriz. Parazitin dayanıklı bitkiye inokule edilmesi ile enfeksiyon başlar. Ancak deneylerde kullandığımız çeşitler dayanıklı olduklarından fungusun püstüllerinin gelişmesini engellerler. Bu yüzden inokulum çevresinde oluşan nekrotik alandaki, ölü konak hücreleri ile birlikte RNA miktarında 1. günden başlayan düşüş gözlemlenmiştir. Fakat kontrol bitkilerinde normal gelişim devam ettiği için, bunun doğal sonucu olarak ilk günlerdeki artış ortaya çıkmıştır.

Hassas Little Club ve Cheyenne çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki 1 ile 5. günlerde DNA miktarındaki artışı görmekteyiz. Daha önce Allen'in (1923) çalışmasında anlatıldığı gibi konak mezofil hücre çekirdeklerinin büyümesi esnasında RNA artışından bahsedilmişti. Bunun yanında enfekte bitkilerin hücrelerinde DNA'nın miktarında artar. ör. *Plasmodia spora brasicæ* ile enfekte lahana hipokotil hücrelerinde, konak çekirdek

genişlemesi timidin H³ in artan birleşmesi ile birlikte olur, ve spesifik lekelenme DNA sentezinin çekirdek büyümesi ile birlikte olduğunu gösterir. (William, 1966)

Bir başka çalışmada *Puccinia graminis* var. *tritici* ile enfekte bitkilerde DNA miktarında önemli değişiklik olmadığı aksine patojen tarafından saldırıyla uğrayan konak hücrede çekirdek ve çekirdekçiklerin genişlemesinin hücrenin RNA miktarının 2 katına çıkması ile bir arada olduğu gösterilmiştir. Bu artan RNA miktarının parazitten geldiği söylenebilir, çünkü *Puccinia graminis* var. *tritici*'nin büyüyen hifleri ve gelişen uredosporları bol RNA ihtiva ederler. (Quick ve Shaw, 1964; Whitney, 1962) Hastalıklı yapraklardaki RNA'nın ilk analizleri bunun karakteristik konak ve tipik uredospor karışımı bir RNA olduğunu göstermiştir. (Quick ve Shaw, 1964)

Bu sonuçlara ters düşen bir bulgu Rohringer ve arkadaşları (1961) tarafından rapor edilmiştir. Bu araştırmacılar *Puccinia recondita* ile enfekte buğday yapraklarında, enfeksiyonu takip eden 24 saat içinde hem dayanıklı, hemde hassas bitkilerde ribonükleaz aktivite artışı gözlemlerdir.

Çalışmalarımızda MB 81, MB 83, MB 84 dayanıklı çeşitlerinde *Puccinia graminis* var. *tritici* enfeksiyonundan sonraki günlerde RNA miktarındaki düşüş göz önüne alınırsa, bu bitkilerde ribonükleaz aktivitesinin yükselerek RNA kaybına neden olduğunu söylemek mümkündür. Orta dayanıklı ve hassas buğday çeşitleri ile yaptığımız çalışmalarında RNA miktarındaki artışı belirli bir nedene bağlamak veya artışın konak-patojen ikilisinin

yalnız birisinden geldiğini söylemek mümkün olamaz. Yaptığımız çalışmalarda artışın nereden geldiği konusunu aydınlatacak bir deney yapmadık. Bizim sonuçlarımız konak-parazit ikilisinin ortaklaşa katkısı ile ortaya çıkan sonuçlardır. Bu artışın nedenini yorumlarken spesifit RNA moleküllerinin sentezindende söz etmek yararlı olacaktır. Tüm yaşayan hücreler ribozomal-RNA transfer-RNA, messenger-RNA içerirler. Bu 3 gruptan r-RNA toplamının % 80 nini teşkil eder. Yeşil bitki hücrelerinde çok çeşitli r-RNA tipleri vardır. Ribozoma bağlı olarak 3 değişik RNA görülür. (Callow, 1972) Yaprağın yaşına bağlı olarak total RNA'nın 2/3 veya 1/2'sini 80S stoplazmik ribozomlar, geri kalanını ise 70S kloroplast ribozomları oluşturur. Total RNA degerinin yanında çok küçük bir değer tutan mitokondrial RNA ların varlığında rapor edilmiştir. (Ingle, 1970) Yapılan bir çok çalışmaların ışığında hassas dokuların pas fungusu ile enfeksiyonu konak hücrelerinin r-RNA sentezinde küçük ve erken artışlarla sonuçlanır. Bu da net RNA sentezinde gözükmemeyebilir. Hem pas, hemde külleme enfeksiyonlarının ileri safhalarındaki en belirgin etki kloroplastik nükleik asit miktarının azalması ile sonuçlanan yaprak yaşılanması hızlandırılmıştır. Halbuki total r-RNA durumunda fungal nükleik asit sentezine bağlı olarak belirgin bir artış vardır. Fakat bu artışın nedeni ekstra konak ribozomal RNA sentezinin artmasında olabilir. (Quick ve Shaw, 1967; Hamilton, 1969)

Çalışmalarımızda hassas konak-patojen biriminde yüksek oranda RNA artışı görmemize rağmen, bu artışa neden olan

RNA'nın kökeni konusu tartışmaya açıktır. Dayanıklılık mekanizmasında asıl etkenin RNA olduğu göz önünde tutularak bu artışın kökenini araştırmakta yarar vardır. (Callow, 1976)

Dayanıklılık mekanizmasında RNA'nın rolünü tesbit etmek için yapılan bir dizi çalışmada aktif etkenin RNA olduğu gösterilmiştir. Özet olarak hastalık dirençliliği için spesifik bir gen ile oluşturulan RNA'nın direkt olarak hassas bir konakta direnç cevabı başlatmaktan sorumlu olduğu açıklanmıştır. (Rohringer, 1974) Buğday gövde pasına dayanıklılık reaksiyonu ile direkt alakalı olan RNA çeşidinin tesbit edilmesi, çalışmalarda belirtilen artışın kaynağını ortaya çıkaracaktır.

Total DNA ve total RNA miktarlarındaki değişiklikler hakkında yapılan çalışmaların yanında, dayanıklılık mekanizması ile yakından ilgili olması nedeni ile azot metabolizmasında çalışılmıştır. Pas fungusu tarafından oluşturulan hastalık larda azot bileşiklerinin enfeksiyon bölgesinde toplandığı konusunda bulgular vardır. Bu toplanma hassas bitkilerde enfeksiyondan dolayı sentezdeki genel artışın sonucudur. (Shaw ve Colotel, 1961) buğdayın hassas bir çeşidi üzerinde birikimin analizini yapmışlar ve konakta fungus gelişirken total protein ve çözünür azot ve aynı zamanda çözünür ve çözünmez azot oranında sağlıklı bitkilere göre bir artışın olduğunu göstermişlerdir. Enfekte dokulardaki kuru ağırlık miktarının 1 kat artması protein azotunun 2 katına, serbest amino asitler ve amino bileşiklerinin 4 katına çıkışmasını sağlamıştır. Bu bileşiklerin en önemlileri aspartik asit, glutamik asit, serin ve glutamindir. Bu amino asitler top-

lamın % 90'ını teşkil ederler. Buna karşın dayanıklı bir çesidin enfeksiyonu protein ve çözünür azot indirgenmesine neden olur. Rohringer (1957) enfeksiyonun yaprak proteinlerinin amino asit kompozisyonunu değiştirmedigini gösterdi.

Siebert (1961) yaptığı çalışmalarla hem hassas, hem de dayanıklı çeşitlerde amino asit konsantrasyonunda bir artış buldu. Aynı zamanda tiyokarbazid, semikarbazid veya fluoroasetik asit gibi pas gelişimini engelleyen maddeler ile muamelede yapraklarda amino asit birliğini saptadı.

Birikimin diğer bir özelliğide kök pası ile enfekte olan bitkiler için karakteristik olan amino asitler ve glutamin seviyelerindeki artışın sağlıklı bitkilerin amonyak ihtiyacı karşılanarak stimule edilebilmesidir. (Kiraly ve Farkas, 1961) Kochen (1948) yapraklardaki amino asit konsantrasyonunda artış, protein miktarındaki azalmanın yulaf yapraklarında kısmen hastalık gelişiminin ileri dönemlerinde oluştu; Murphy'nin (1936) hassas yulaf bitkisinin pas ile enfeksiyonunda çözünür azotta, amonyak, amid, nitrat ve nitrit olarak oldukça yüksek bir artış gözlediğini rapor etmelerine karşın Nilova ve Stephanova (1958) tarafından yapılan çalışmalar ^{bu}bugday yaprakları ve yaprak pası için bu sonuçların tersi rapor edilmiştir, çünkü enfeksiyon soazotun çözünür formlarında amino asitler ve polipeptidler şeklinde düşüşler ve protein miktarında artışlar olarak gözlenmiştir. Bulgularımız Nilova ve Stephanova'nın çalışmalarındaki sonuçları desteklemektedir.

Çalışmalarımızda dayanıklı MB 81, MB 83 ve MB 84 çeşitlerinden elde edilen serbest amino asit azotu eğrileri ortak bir benzerlik göstermektedirler. Her üç çeşittede enfeksiyondan sonra 5. günde serbest amino asit azotu miktarı maksimum değerine ulaşır. Bu dayanıklı çeşitlerin Puccinia graminis var. tritici'nin gelişimini büyük ölçüde engellediği biliniyor. (Rohringer ve Heitefuss, 1961; Whitney, 1962) Ayrıca fungus gelişimini engelleyen maddelerin amino asit birikimine neden olduğu da biliniyor. (Siebert, 1961) Bu verilere dayanarak sonuçların doğal olduğunu söyleyebiliriz.

Bir başka yaklaşımla, dayanıklı çeşitlerde enfeksiyon sonrasında RNA miktarının düşüşü amino asit birikimi indüklüyor olabilir, çünkü protein sentez sistemindeki ana molekül RNA dır. RNA miktarının düşmesi protein sentez hızını yavaşlatabaktır, dolayısıyla protein yapımında kullanılamayan amino asitler serbest kalacaklardır. Bu yaklaşımmda deney sonuçlarımızi desteklemektedir. Aynı bitkilerde 5 ile 9. günlerde serbest amino asit azotu düşüş gösterirken 9 ile 12. günlerde çok az bir artış görülmektedir. Bu üç dayanıklı çeşidin kontrol bitkilerinde ise serbest amino asit azotu miktarı enfekte bitkilerin altında kalmaktadır.

Amino asitler, gelişen dayanıklılığa neden olacak kadar fungitoksik degillerdir ve uygulamaya tabi tutulan bitkilerin ekstraktlarında fungitoksik bileşikler bulunamamıştır. Görünüşe göre bitkileri dayanıklı hale getirebilmek için amino asitler bitkilerin metabolizmasını indirekt olarak değiştirirler?

Dayanıklılığı artıran bileşiklerin ortak bir özelliği bitkiler üzerindeki oksin etkisini değiştirmeleridir. (van Andel, 1962) Bir diğer çalışma dayanıklılığın amino asitleride içine alan metabolik reaksiyonlara dayandığını ileri sürer. (Fuchs ve Bauermeister, 1958; Siebert, 1961)

Hastalıklı bitkilerde daha az hassas metodlarla protein sentezi konusunda yapılan deneylerde patojene bağlı olarak protein sentezi artışı ortaya çıktığını, hastalık gelişiminin ileri safhalarında total azot miktarı ^{fungus} ile enfekte organlarda genellikle düşüğünü ortaya koymustur. Kural olarak düşen azot miktarları enfekte dokularda hücre yapısının bozulması ile ilgiliidir. ve proteolitik enzimlerin artan aktivitesine bağlıdır. Aynı zamanda dokunun amonyak miktarının artmasının sonucu olarak deaminaz ve deamidazlar dokuda aktive olmuş olabilirler. Yapraklardaki serbest amonyak miktarı sadece gövde pasının bir üçte ile enfekte olmuş buğday yapraklarında artar. (Kiraly ve Farkas, 1961) Pas hastalıklarında fungusun sporulasyon zamanında deaminaz ve deamidaz enzimlerinin ortaklaşa aktivasyonu ile serbest amonyak miktarı sürekli artar. Diğer bir durumda da pas enfekte bitkilerde amino asit ve amid sentezinin enzimleride artar. ve sonuçta çeşitli amino asit ve amid seviyeleri yükselir. (Rudolph, 1963)

Hassas Little Club, Michigan Amber ve Cheyenne çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde serbest amino asit azotu miktarları düşüş gösterir. Aynı düşüşü bu çeşitlere ait kontrol bitkilerinde de gözledik. Bu düşüş normal gözükmektedir, çünkü

çeşitler hassas olduğu için pasın gelişimine engel olamayacaklardır. Bunun sonucunda da RNA miktarı ve ona bağlı olarak protein sentez hızı artacaktır, (Quick ve Shaw, 1964) ve ortam-daki serbest amino asitler protein sentezinde de kullanılacağı için serbest amino asit azotu miktarında bu kombinasyona bağlı olarak düşecektir. Hassas çeşitlere ait RNA miktarları 5. güne kadar artış, ondan sonraki günlerde de düşüş gösterdiğini belirtmişlik. Grafiklerdende anlaşılabileceği gibi, belirtilen günlerde RNA miktarındaki düşüşü, serbest amino asit azotu miktarındaki artış izlemektedir. Çalıştığımız dayanıklı, orta dayanıklı ve hassas çeşitlerde *Puccinia graminis* var. tritici ile enfekte bitkilerdeki serbest amino asit azotu miktarı kontrol bitkilerine oranla daima yüksektir.

Pas hastalığında proteolizde ve protein sentezinde paralel bir artış olur. Bu durum Rudolph(1963) tarafından ilginç bir çalışma ile gösterilmiştir. *Puccinia graminis* var. tritici ile enfekte buğday yapraklarında azot metabolizmasını koparılmış ve koparılmamış yapraklarda inceledi. Enfekte bitkilerin koparılmamış yapraklarında kısmi proteoliz, serbest amino asit ve amid birikimi görüldü. Koparılmış yapraklarda ise enfeksiyonдан sonra serbest amino asit ve amidlerde de düşüş gözlandı. Koparılmış sağlıklı yapraklarda ise yüksek oranda proteoliz ile amino asit ve amid birikimi oldu.

Benzer şekilde yapılan çalışmalar sonucunda paslı fasulyede benzer enzim-protein sentezi bağıntısı bulunmuş. Enfeksiyon konakta bazı stoplazmik enzim proteinlerinin sentezinin

artışını stimule ederken başka bir mitokondriyal proteinin kaybına neden olur. (Stables ve Stahman, 1963) Parazitik olarak indüklenen protein sentezi pas ile enfekte buğdayda görülen belirgin RNA artışı ile kuvvetli bir şekilde bağıntılıdır. Bu duruma çekirdekteki büyümeye, RNA'nın yeri ve protein birikimi de katılırlar. (Person, 1960; Whitney, Shaw ve Naylor, 1962; Quick ve Shaw, 1964)

Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgular birleştirilerek değerlendirilirse, yukarıda kaynakları belirtilen bilgiler ve bulguların çoğunluğunu destekleyen sonuçlardır. Gerek dayanıklı, gerekse hassas çeşitlerden alınan sonuçlarda RNA değerlerinin düşerken, serbest amino asit azotu miktarının artışı anlamlı bir sonuçtur. Çalışmalarımızın ortak sonucu olarak davranışılık mekanizmasında DNA, RNA ve protein ilişkisinin ortaklaşa değerlendirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Fakat bazı araştıracıların hastalığa karşı dayanıklılık oluşturulmasında RNA'nın etkin olduğunu ileri sürmelerine karşın RNA-protein ikilisinin birbirini tamamladığı ortadadır. Gerek hassas gerekse dayanıklı çeşitlerden elde edilen sonuçlar (grafiklerden de görülebileceği gibi) bu görüşümüzü kuvvetlendirmektedir. Enfeksiyonдан sonra amino asit azotu miktarı artarken, RNA miktarının düşüşü veya bunun tersi, bu bağıntıyı iyi açıklamaktadır.

Gerçektende RNA'nın transkripsiyonunu izleyen translasyon kademesinde serbest amino asitler kullanılarak protein sentezi gerçekleştirilir. Bunun sonucunda ortamdaki serbest amino asit azalırken protein sentez hızı artacaktır.

Pas gelişimini engelleyen maddeler yaprakta amino asit birikimini artırırken protein sentez hızını yavaşlataba-
tır. Aynı zamanda ribonükleaz aktivitesinin artışı RNA seviye-
sinide düşürecektir. Bütün bu sonuçlara rağmen dayanıklılık me-
kanizmasında görevli etkenler ayrıntılı olarak ele alınmalıdır.
Aksi takdirde dayanıklılık mekanizması ile ilgili bir çok konu
tartışmaya açık kalacaktır.

ÖZET

Dayanıklılıkları farklı bazı buğday çeşitleri, buğday yaprakları üzerindeki zararlı etkisi saptanmış olan *Puccinia graminis* var. tritici ile enfekte edilerek enfeksiyondan sonraki 1, 5, 9 ve 12. günlerde alınan örneklerde total DNA, total RNA ve serbest amino asit azotu tayini yapılmıştır.

DNA miktarı dayanıklı MB 81 ve MB 84 çeşitlerinde enfeksiyondan sonra 1 ve 9. günler arasında düşüş gösterirken, 9 ve 12. günler arasında MB 81 de az bir artış olmuş, MB 84 te de düşüş devam etmiştir. Dayanıklı MB 83 çeşidinde enfeksiyondan sonra 1 ve 5. günler arasında çok hafif bir artış, 5 ve 9. günler arasında hızlı bir düşüş, 9 ve 12. günler arasında çok az bir artış gözlenmiştir. Orta dayanıklı MB 121, hassas Little Club ve Cheyenne çeşitlerinde DNA artışı enfeksiyondan sonra 5. günde maksimum değerine ulaşmış, daha sonraki günlerde ise düşüş başlamıştır. Buna karşın hassas Michigan Amber çeşidinde ise sürekli düşüş gözlenmiştir. Dayanıklı ve hassas çeşitlerde enfeksiyondan sonra 9 ve 12. günler arasında DNA miktarı fazla bir değişim göstermemiştir.

RNA miktarları dayanıklı MB 81, MB 83 ve MB 84 çeşitlerinde enfeksiyondan sonraki günlerde sürekli düşerken, orta dayanıklı MB 121, hassas Little Club, Michigan Amber ve Cheyenne çeşitlerinde enfeksiyondan sonra 1 ve 5. günler arasında sürekli yükselmistiştir. Hassas çeşitlerde enfeksiyondan sonra 5. günde maksimuma ulaşan RNA miktarları 5 ve 12. günler arasında sürekli düşüş göstermişlerdir.

Serbest amino asit azotu ise dayanıklı-konak patojen birimlerinde enfeksiyondan sonra 1 ve 5. günler arasında artış gösterirken, 5 ve 9. günler arasında arasında düşmeye başlamış, 12. güne doğru ise tekrar artmıştır. Hassas konak-patojen birimlerinde enfeksiyondan 1 ve 5. günler arasında serbest amino asit azotu düşerken, 5 ve 12. günler arasında ise çok az bir artış gösterir.

Dayanıklılık mekanizmasında total DNA, total RNA ve serbest amino asit azotu arasındaki ilişkinin rolü tartışılmış, özellikle RNA-serbest amino asit ilişkisinin dayanıklılıktaki etkin rolü üzerinde durulmuştur. Pas gelişimini engelleyen maddelerin yaprakta amino asit birikimine neden olduğu durumlarda dayanıklı çeşitlerde serbest amino asit azotu miktarının artışı buna delil olarak gösterilmiştir. Hassas konak-patojen birimlerinde ise artan protein sentezine bağlı olarak düşüş gözlenmiştir.

LITERATÜR

- 1- Allen, R. F. 1923. Cytological studies of infection of Baart, Kanred and Mindum wheats by *Puccinia graminis tritici* foms III and ~~XIX~~. J.Agr. Res. 26:571-604
- 2- von Andel, O.M.1962.
Phytopath. Z. 45,66-80
- 3- Bennet,J. and Scott, K. J.(1971b)
Pl. Path. 1,185-198
- 4- Bhattacharya, P. K., Naylor, J. M. and Shaw, M. (1965)
Nucleic acid and protein changes in wheat leaf nuclei during rust infection. Science 150,1605-1607
- 5- Callow, J. A. (1976)
Biochemical Aspects of plant-parasite relationship
Chap. 15. Nucleic acid metabolism in biotrophic infection.
- 6- Callow, J. A.,Callow, M. E. and Woolhouse, H. W..(1972)
Cell Differentiation 1,79-90
- 7- Chakravorty, A. K. and Shaw, M. (1971)
Biochem. J. 123,551-558
- 8- Fuchs, W. H. and Bauermeister, R. (1958)
Naturwiss. 45,343-344
- 9- Hamilton, W. E. (1969). M. A. thesis ,
University of Saskatchewan, Canada.
- 10- Hart, H. (1929)
J. Agric. Res. 39,929-948

- 11- Hart,H and I.L. Forbes.(1935)
The effect of light on the initiation of rust infection. *Phytopathology*. 25:715-725
- 12- Hedley, C.L. and J.L. Stoddart. (1972)
Patterns of protein synthesis in *Lolium temulentum* (L)
J. Expt. Botany. 23,1972,490-501
- 13- Heitefuss,R.(1964)
Z. Pflkrankh. 71,154-158
- 14- Heitefuss,R.(1965)
Untersuchungen zur Physiologie des temperatur gesteuerten Vertraglich keitsgrades von Weizen und *Puccinia graminis tritici*. I.Veranderungen von sauerstofaufnahme und Phosphatstoff-weschsel. *Phytopathol.Z.* 54:379-400
- 15- Heitefuss,R.(1966b)
Nucleic acid metabolism in obligate parasitism.
Ann.Rev.Phytopathol. 4:221-244
- 16- Holdgate,D.P. and T.W.Goodwin(1965)
Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acid. *Phytochemistry*.4.1965,831-843
- 17- Ingle,J.,Possingham,J.V.,Wells,R.,Leaver,C.J. and Loening, V.E.(1970)
Soc.Exptt.Biol.Symposia., 24,303-305
- 18- Kiraly,Z. and G.L. Farkas.(1961)
Amide metabolism in wheat leaves infected with stem rust. *Physiol.Plantarum*.14:344-353

- 19- Malca,I.,Zscheile,F.P. and Gulli,R.(1964)
Phytopathology,54,1112-1116
- 20- Mehta,M and Melander,L.W.(1935)
Effect of temparature and light on devolopment of the
uridinal stage of Puccinia graminis. Jour.Agr.Res.
50:861-880
- 21- Millerd,A and Scott,K.J.(1963)
Host-pathogen relations in powdery Mildew of Barley:
III.Utilisation of respiratory energy.
Australian.J.Biol.Sci.16,775-783
- 22- Murphy,H.C.(1936)
Phytopathology,26,220-234
- 23- Nilova,V.P. and Stephanova,N.G.(1958)
Tr.Vses.In-ta Zashity Rastenii,13,185-192
- 24- Pederson,T. (1969)
Use of diphenilamin as a colorimetric reagent for ri-
bonucleic acid. Phytochemistry.4.1965,831-843
- 25- Person,C.(1960)
A preliminary note on the histochemical localisation
of DNA and RNA in rust-infected wheat leaves.
Can.J.Gent?Cytol.2:103-104
- 26- Plumb,R.T.,Manners,J.G. and Myers,A.(1968)
Trans.Br?mycol.Soc.51,563-573
- 27- Pozsar,B.L.,K.Kristev. and Z.Kiraly.(1966)
Rust resistance induced by amino acids:A decrease of
the enhanced protein synthesis in rust-infected bean

leaves. Acta Phytopathol. Hung. 1:203-208.

- 28- Quick,W.A. and Shaw,M.(1964)

The physiology of host-parasite relations:XIV. The effect of rust infection on the nucleic acid content of wheat leaves. Can.J.Bot. 42, 1533-1544

- 29- Rohringer,R.(1957)

Untersuchungen zur Biochemie von Weinzenkeipfblanzen nach Infektion mit Puccinia graminis tritici Erikss. und Henn. Ph.R. 126 A. Phytopathol.Z. 29:103-104

- 30- Rohringer,R and Heitefuss,R.(1961)

Incorporation of $^{32}P_i$ into ribonucleic acid of rusted leaves of wheat. Can.J.Bot. 39, 263-267

- 31- Rohringer,R., Howes,N.K., Kim,W.K. and Samborski,D.J.(1974)

Nature 249, 585-588

- 32- Rudolph,K.(1963)

Weitere biochemische Untersuchen zum Wirt-Parasit-Verhaltnis am Biespiel von Puccinia graminis tritici :I
Der Einfluss der Infektion auf den Sauerstoffwechsel.
Phytopathol.Z. 46:276-290

- 33- Samborski,D.J. and F.R. Forsyth.(1960)

Inhibition of rust development on detached wheat leaves by metabolites, antimetabolites, and enzyme poisons.
Can.J.Botany. 38:467-476

- 34- Samborski,D.J. and Shaw,M.(1956)

The physiology of host-parasite relations.II.The effect of Puccinia graminis tritici Eriks. and Henn. on the

- respiration of the first leaf of resistant and susceptible species of wheat. Can.J.Botany, 34, 601-619
- 35- Shaw, M. and N. Colotelos. (1961)
The physiology of host-parasite relations: VII. The effect of stem rust on the nitrogen and amino acids in wheat leaves. Can.J.Botany 39:1351-1372
- 36- Siebert, R. (1961)
Phytopathology Z. 40, 221-244
- 37- Stables, R.C., and M.A. Stahmann. (1963)
Malate dehydrogenases in rusted bean leaf.
Science 140:1320-1321
- 38- Whitney, H.S., Shaw, M. and Naylor, J.M. (1962)
The physiology of host-parasite relations: XIII. A cyto-photometric study of the distribution of DNA and RNA in rust-infected leaves. Can.J.Bot. 40, 1533-1544
- 39- Williams, P.H. (1966)
A cytochemical study of hypertrophy in clubroot of cabbage. Phytopathology, 56:521-524
- 40- Wolf, G. (1968)
On the incorporation of ^{32}P into the various nucleic acid fractions of rust infected primary leaves.
Neth. J.Pl.Path. 74, (Suppl.I), 19-23
- 41- Wong, D. and Mancini, D. (1966)
Biochim. biophys. Acta. 129, 231-239
- 42- Yirgau, D. and Caldwell, R.M. (1963)
Science N.Y. 141, 272-273